

# **Untersuchung der Gen-Umwelt Interaktion in der Pathogenese allergischer Erkrankungen am Beispiel des CD 14 Gens**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH

Vorgelegt von           Hasemann, Kathrin

aus                         Hannover

Giessen 2006

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Leiter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

des Fachbereichs Medizin des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH

Gutachter: Prof. Dr. Bein

Gutachter: PD Dr. Niemeier

Tag der Disputation: 24.05.2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhalt	Seite
1. <b>Einleitung</b> .....	4
1.1. Immunsystem .....	4
1.2. Allergie .....	5
1.3. Atopie.....	8
1.4. Pathophysiologie der Allergie .....	11
1.4.1. Die TH1/TH2-vermittelte Immunreaktion.....	11
1.4.2. Immunglobulin E (IgE) .....	13
1.5. Toll-like Rezeptoren .....	15
1.6. Lipopolysaccharid (LPS) .....	18
1.7. CD14.....	19
1.8. Die Hygiene-Hypothese.....	20
1.9. CD14 als Kandidatengen atopischer Erkrankungen .....	23
1.10. Zielsetzung .....	25
2. <b>Material, Probanden und Methoden</b> .....	27
2.1. Geräte, Kleinmaterial und Reagenzien .....	27
2.1.1. Geräte .....	27
2.1.2. Kleinmaterial.....	28
2.1.3. Reagenzien .....	28
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	29
2.1.5. Computerprogramme.....	30
2.2. Probanden .....	31
2.2.1. Blutspender.....	31
2.2.2. Kinder aus der ISAAC-Studie.....	32
2.3. Methoden .....	33
2.3.1. DNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung .....	33
2.3.2. Oligonukleotid- <i>Primer</i> .....	33
2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	34
2.3.4. PCR mit sequenzspezifischen Primern (SSP-PCR).....	35
2.3.5. DNA-Gelelektrophorese.....	38
2.3.6. DNA-Sequenzierung.....	39

2.3.7.	Nephelometrie .....	40
2.3.8.	ELISA .....	41
2.3.9.	Statistik .....	41
3.	<b>Ergebnisse</b> .....	43
3.1.	1. Explorative Untersuchung.....	43
3.1.1.	Grund- und Anamnesedaten der Probanden .....	43
3.1.2.	Assoziation der Anamnesedaten mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum.....	44
3.1.3.	PCR-SSP Genotypisierung der Polymorphismen des CD14-Antigens.....	45
3.1.4.	Der IgE-Spiegel im Serum ist mit den CD14-159C>T (rs2569190) und CD14-1145A>G (rs2569191) SNPs assoziiert .....	48
3.1.5.	Der sCD14-Spiegel im Serum ist mit den Genotypen CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191) und CD14-1359G>T (rs3138078) assoziiert.....	50
3.2.	Replikationsstudie .....	53
3.2.1.	Grunddaten der Probanden.....	53
3.2.2.	Der IgE-Spiegel im Serum ist mit Alter und Geschlecht der Probanden assoziiert .....	54
3.2.3.	PCR-SSP Genotypisierung des CD14-159C>T (rs2569190) SNP in der Replikationsstudie.....	57
3.2.4.	Der IgE-Spiegel im Serum ist nicht mit dem CD14-159C>T (rs2569190) SNP assoziiert .....	57
3.3.	Stratifizierung nach der Jahreszeit der Blutentnahme .....	59
3.3.1.	Die nach der Jahreszeit stratifizierten Probandengruppen zeigen keine Assoziation zwischen SNP und IgE-Spiegel im Serum .....	61
3.4.	Kinder aus der ISAAC-Studie .....	63
3.4.1.	Kollektiv Dresden .....	63
3.4.2.	Kollektiv München .....	63
3.4.3.	Ergebnisse der Kollektive München und Dresden im Vergleich mit dem Giessener Kollektiv.....	64

4.	<b>Diskussion</b> .....	65
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	65
4.2.	Das CD14 Antigen im Rahmen der Hygiene-Hypothese und atopischer Erkrankungen .....	67
4.3.	Die wichtigsten genetischen Assoziationsstudien über CD14 als Atopie- Kandidatengen.....	68
5.	<b>Zusammenfassung</b> .....	77
6.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	81
7.	<b>Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis</b> .....	89
8.	<b>Lebenslauf</b> .....	92
9.	<b>Danksagung</b> .....	95

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Immunsystem

Als Immunsystem (lat. immunis = frei, unberührt) werden Organe, Zellen und Eiweißkörper zusammengefasst, deren Funktion in der Erhaltung der Individualstruktur durch die Abwehr körperfremder Substanzen und Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen, besteht. Voraussetzung dafür ist, dass das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden kann, so dass im Normalfall keine Immunreaktion gegen den eigenen gesunden Körper erfolgt ("immunologische Toleranz"). Allerdings ist es ebenfalls Aufgabe des Immunsystems, krankhafte körpereigene Zellen zu erkennen und anzugreifen.<sup>1</sup>

Die im Laufe der Evolution entwickelte Abwehr des Körpers gliedert sich in zwei Hauptsysteme: die angeborene Abwehr und die erworbene Abwehr gegen Krankheitserreger. Die angeborenen und erworbenen Abwehrmechanismen sind eng miteinander vernetzt.<sup>1</sup>

Die angeborene Immunabwehr besteht aus physikalischen Barrieren, Granulozyten, Makrophagen und chemischen Barrieren (Lysozyme etc.). Die erworbene Immunabwehr ergibt sich aus der Interaktion antigenunspezifischer Mechanismen (Aktivierung von Makrophagen, Aktivierung von Komplement) mit nachfolgend hochspezifischer Erkennung (Antikörper und  $\alpha\beta$ -T-Zellen).<sup>2</sup>

Viele Komponenten, die bei der erworbenen Immunabwehr eine Rolle spielen, tragen auch zur angeborenen Abwehr bei (natürliche Antikörper, Komplement, Interleukine, Interferone, Makrophagen, natürliche Killerzellen).<sup>2</sup>

## 1.2. Allergie

Unter einer Allergie versteht man eine von der Norm abweichende ge- bzw. übersteigerte Reaktion des Immunsystems auf bestimmte Stoffe, die sogenannten Allergene, die durch wiederholten Kontakt mit diesen Allergenen erworben wird. Der Begriff Allergie stammt aus dem Griechischen (allo = fremd, anders; ergon = Reaktion, Tätigkeit). Clemens von Pirquet hat 1906 erstmals die von der Norm abweichenden Reaktionen des menschlichen Organismus auf von außen einwirkende Stoffe als Allergie bezeichnet. Die Allergie umfasste damals sowohl die Überempfindlichkeit (Hyperergie) als auch die abgeschwächte Empfindlichkeit (Hypergie) und die fehlende Empfindlichkeit (Anergie). Heute wird der Begriff ausschließlich für die erworbene Überempfindlichkeit gegenüber bestimmten, von außen auf den Körper einwirkenden Stoffen verwendet. Stoffe, die die Fähigkeit besitzen, eine Allergie auszulösen, bezeichnet man als Allergene.

Nach dem jeweiligen Aufnahmemechanismus können folgende Formen der Allergie unterschieden werden:

- Inhalationsallergien
- Nahrungsmittelallergien
- Arzneimittelallergien
- Insektengiftallergien
- Parasitäre oder mikrobielle Allergien
- Kontaktallergien

Der britische Pathologe Robin C. Coombs beschrieb gemeinsam mit seinem Kollegen Gell vier Typen allergischer Reaktionen (Typ I - IV).<sup>3</sup>

### 1. Typ-I: Überempfindlichkeit vom Soforttyp: Anaphylaxie

Die Ursache der Typ-I-Reaktion besteht unter anderem in einer überschießenden Bildung von IgE-Antikörpern. Durch bestimmte Allergene wird eine IgE-Antikörperbildung hervorgerufen. Dabei verläuft der erste Kontakt des Patienten mit dem Allergen für ihn unbemerkt. Das Immunsystem reagiert mit der Bildung antigenspezifischer Antikörper, es wird sensibilisiert. IgE-Antikörper werden über IgE-Rezeptoren an Mastzellen gebunden. Bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Allergen erfolgt eine sofortige Degranulation der Mastzellen.



Es kommt zur Ausschüttung von Histamin und anderen Mediatoren. Bei der Typ-I-Reaktion kommt dem Entzündungsmediator Histamin eine besondere Bedeutung zu. Histamin bewirkt eine Erweiterung der Gefäße, eine erhöhte Durchlässigkeit der Kapillaren und eine Verengung der Bronchien. Bei den Patienten führen diese histaminvermittelten Wirkungen zu Schwellung, Rötung und verstärkter Sekretion der entsprechenden Schleimhäute sowie zu Atemnot. Mit dem Blut kann sowohl das Allergen, als auch Histamin im Körper verteilt werden und so auch an anderen Orten als der Eintrittspforte des Allergens zu Symptomen führen. Die Symptome treten bei der Typ-I-Reaktion sofort bis ca. 1 Stunde nach einem Allergenkontakt auf und halten nur solange an, wie das Allergen im Organismus vorhanden ist. Für die auftretenden Symptome ist es unwesentlich, welches Allergen vorliegt. Ein typisches Beispiel ist der Heuschnupfen mit einer geschwollenen Nasenschleimhaut, vermehrter Produktion von Nasensekret und Tränenflüssigkeit, Niesen und Juckreiz an den Augen sowie einer Schwellung der Augenlider. Findet die Typ-I-Reaktion in der Lunge statt, entsteht das Bild des Asthma bronchiale mit Atemnot durch Verengung der Bronchien, durch eine Schwellung der Schleimhaut sowie durch eine übermäßige Produktion von Bronchialsekret. Bei Allergenen, die stark sensibilisierend wirken, kann durch eine massive Histaminfreisetzung ein anaphylaktischer Schock ausgelöst werden. Er kann innerhalb von wenigen Sekunden bis zu einer Stunde nach Allergenkontakt auftreten und betrifft mehrere Organsysteme gleichzeitig, wobei am häufigsten das Herz-Kreislauf-System, die Atemorgane, der Magen-Darm-Trakt sowie die Haut betroffen sind. Erste Zeichen sind meist ein Hitzegefühl bei gleichzeitigem Ausbruch von kaltem Schweiß, Juckreiz, Übelkeit und Erbrechen. Die Patienten müssen intensivmedizinisch behandelt werden. Die Diagnose der Allergie ist infolge der Vielfalt der möglichen Allergene häufig erschwert. Am Anfang der Diagnostik steht immer die genaue Anamnese, insbesondere zu Zeit und Ort des Auftretens der Allergie sowie der Symptome. Labortechnisch kann im Blut der Gesamt-IgE-Spiegel bestimmt werden. Ein erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel kann Hinweise auf eine Typ I-Überreaktion geben. Zur weiteren Diagnostik können Allergietests am Patienten durchgeführt werden. Beim klassischen Allergietest wird das Allergen in die Haut verabreicht. Die Haut als Testorgan hat den Vorteil, dass mehrere Allergene gleichzeitig nebeneinander getestet werden können. Beim Prick-Test wird das Allergen mit einer sehr dünnen Nadel in die Haut gespritzt. Beim Patch-Test wird die Hornschicht vorsichtig abgeschliffen und das Allergen unter einem Okklusionsverband auf die vorbehandelte Stelle aufgetragen. Die allergische Typ-1-Reaktion erkennt man an einer Quaddelbildung, einer Schwellung und Rötung der Haut sowie am Juckreiz wenige Minuten nach Allergenkontakt.<sup>1</sup>

Der Atopie-Patch-Test kann sowohl zu Sofortreaktionen vom Typ I als auch zeitverzögert zu Spättyp-Reaktionen an der Haut führen, etwa zur Verschlechterung eines Ekzems.<sup>4,5</sup>

Eine Alternative stellt die Bestimmung allergenspezifischer IgE-Antikörper dar. Auf dem Markt befinden sich verschiedene Verfahren (RAST, EAST, FAST, CAP, MAST-CLA, Allercoat, Magic Lite und andere mehr). Gemeinsam ist diesen, dass sie im Blut zirkulierende allergenspezifische IgE-Antikörper (semi-)quantitativ erfassen. In speziellen immunologischen Testverfahren, wie Immunoblot und gekreuzter Radioimmunelektrophorese, können spezifische Antikörper gegen Einzelkomponenten in Allergenextrakten nachgewiesen werden. Neuere IgE-Multitests, die Kombinationen häufiger Umweltallergene enthalten, eignen sich zum Screening. Im positiven Fall hat der Patient IgE-Antikörper gegen mindestens eines dieser Allergene. In einem zweiten Schritt kann dann unter Berücksichtigung der Anamnese und in Kombination mit Prick-Hauttest oder IgE-Test das relevante Einzelallergen ermittelt werden. Derzeit zur Verfügung stehende Multitests umfassen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene, verschiedene Pollen-, Schimmelpilz-, Tier- und Milbenkombinationen. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz organbezogener Provokationstests. Dabei wird das Allergen auf natürlichem Wege angeboten, beispielsweise beim Asthma durch Inhalieren.<sup>1</sup>

## 2. Typ II - IV

Die Typ II-Reaktion ist die humorale Immunreaktion vom zytotoxischen Typ. Es handelt sich um Immunreaktionen, die durch IgM- oder IgG-Antikörper gegen Antigene auf Zellmembranen (auch virale Produkte oder Haptene) oder Gewebskomponenten verursacht werden.

Bei der Typ III-Reaktion handelt es sich um Krankheitsbilder, die durch Immunkomplexe verursacht werden. Immunkomplexkrankheiten werden durch Ablagerung von löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen im Gewebe verursacht. Hauptmerkmal ist die Entzündung, bei der Komplement involviert ist.

Die Typ IV-Reaktion stellt die zellvermittelte Überempfindlichkeit vom Spättyp dar. Die Zeitspanne zwischen Antigenkontakt und Krankheitsmanifestation beträgt meist 48 bis 72 Stunden. Typische Krankheitsmanifestationen sind das allergische Kontaktekzem, die Tuberkulinreaktion, Arzneimittelexantheme, Transplantatabstoßung sowie die persistierende, granulomatöse Reaktion.<sup>1</sup>

### 1.3. Atopie

Der Begriff der "Atopie" (griechisch: atopos = "nicht an seiner Stelle") wird häufig genutzt, um IgE-vermittelte Krankheiten zu beschreiben. Atopische Patienten haben eine genetische Disposition, IgE-Antikörper gegen allgemeine Umweltallergene zu produzieren. Weiter haben sie eine oder mehrere atopische Erkrankungen (z. B. allergische Rhinitis, Asthma bronchiale, atopisches Ekzem usw.). Umweltfaktoren sind von großer Bedeutung für die Entwicklung allergischer Reaktionen. Wie das Beispiel der Milbensensibilisierung zeigt, spielen Art und Intensität der Allergenexposition eine wichtige Rolle. Familienuntersuchungen haben die Bedeutung genetischer Faktoren für die Entstehung allergischer Krankheiten bestätigt. Die Häufigkeit allergischer Krankheiten beträgt 40%, sofern beide Eltern, und 20%, sofern ein Elternteil betroffen ist.<sup>6</sup>

#### 1. Allergisches (extrinsisches) Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist definiert als anfallweises Auftreten von Atemnot infolge variabler und reversibler Bronchialverengung durch Entzündung und Hyperreaktivität der Atemwege. Es ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen und betrifft ca. 4-5% der Bevölkerung bei insgesamt zunehmender Inzidenz, insbesondere des gemischtförmigen und infektbedingten Asthma bronchiale. Kennzeichnend ist die Trias Bronchospasmus, Schleimhautschwellung und Dyskrinie. Das im Erwachsenenalter beginnende Asthma lässt sich in weniger als 20% der Fälle auf eine allergische Ursache zurückführen. Häufiger wird bei allergischem Asthma ein Krankheitsbeginn im Kindesalter beobachtet. In diesem Alter sind häufig weitere Äquivalente einer Atopie evident. Charakteristisch sind expositionsbezogene Beschwerden und beschwerdefreie Intervalle. Wichtige Allergene sind:

*Ubiquitär:*

- Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus* und *farinae*), Vorrats- und Speisemilben
- Pollen von Gräsern, Getreide, Bäumen und Sträuchern
- Pilzsporen
- Insektenallergene

*Individuell:*

- Haustiere, insbesondere von Katze, Hund, Pferd, Nagetieren
- Berufsallergene, insbesondere Allergene tierischer, pflanzlicher oder chemischer Herkunft

Charakteristischerweise führt die Allergeninhalation bei Patienten mit exogen-allergischem Asthma zu einer dualen Reaktion.

*Sofortreaktion:*

Innerhalb von Minuten nach Allergeninhalation auftretende Bronchokonstriktion (Sofortreaktion; EAR: early asthmatic reaction), die nach 15-30 Minuten das Maximum erreicht und innerhalb von ca. 2 Stunden abklingt. Die als Folge der Reaktion zwischen Allergen und allergenspezifischen IgE an der Plasmamembran von Mastzellen und Basophilen einsetzende Mediatorfreisetzung bestimmt hauptsächlich das klinische Bild der Sofortreaktion.

*Spätreaktion:*

Die zweite Phase der Bronchokonstriktion (Spätreaktion; LAR: late asthmatic reaction) beginnt nach ca. 4 Stunden, kulminiert nach 6-12 Stunden und klingt innerhalb von 24 Stunden ab. Die Spätreaktion weist die Charakteristika einer protrahiert verlaufenden Entzündungsreaktion mit komplexer Interaktion von Entzündungszellen, insbesondere eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten, und Mediatoren auf. Die Spätreaktion ist offensichtlich für die Chronizität von besonderer Bedeutung, da sie die Entstehung und das Ausmaß der bronchialen Hyperreagibilität (BHR) bestimmt.<sup>6</sup>

## 2. Atopisches Ekzem

Das atopische Ekzem wird synonym auch als Neurodermitis atopica oder endogenes Ekzem bezeichnet. Man unterscheidet eine extrinsische Form (allergisch bedingt) von einer intrinsischen Form (nicht-allergisch bedingt, etwa 20% der Fälle). Das atopische Ekzem ist eine entzündliche, multifaktoriell bedingte Hauterkrankung mit multiplen Facetten und assoziierten Störungen, welche auf dem Boden einer genetischen Prädisposition entsteht und durch verschiedene Umweltfaktoren getriggert wird.<sup>7</sup> Parallel werden psycho- und neurovegetative Ursachen diskutiert.

Die Disposition wird wahrscheinlich ebenfalls polygen vererbt. Die Erkrankung beginnt meist im frühen Kleinkindesalter mit Juckreiz, Rötung, Schuppung, Nässen und Krustenbildung vor allem an den Wangen und dem behaarten Kopf (sogenannter Milchschorf). Im Kindesalter sind meist die Gelenkbeugen (Eczema flexurarum) und häufig das Gesäß betroffen. Beim Erwachsenen sind neben den Gelenkbeugen vor allem Gesicht, Hals, Nacken, Schulter und Brust die häufigsten Lokalisationen der Hautveränderungen. Im Bereich der Erytheme läßt sich ein weißer Dermographismus auslösen. Die Haut ist insgesamt durch eine Unterfunktion der Talg- (Sebostase) und Schweißdrüsen (Hypohidrose) glanzlos und trocken. Ihr Oberflächenrelief ist vergrößert (Lichenifikation). Die Nägel sind meist durch ständiges Kratzen abgenutzt und glänzend. Die Augenbrauen sind abgerieben. Mit zunehmendem Alter nimmt die Intensität des atopischen Ekzems ab. Es verschwindet oft um das 30. Lebensjahr.<sup>8</sup>

### 3. Allergische Rhinitis

Die allergische Rhinitis, synonym auch als Rhinopathia allergica bezeichnet, wird durch eine spezifische Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I der Allergie) ausgelöst. Die Patienten klagen über Rhinitis allergica (sogenannten Heuschnupfen) mit Niesattacken, Muschelödem und wäßriger Hypersekretion. Begleitend tritt zumeist eine Konjunktivitis auf. 30% der Fälle sind mit exogen-allergischem Asthma bronchiale assoziiert. Gelegentlich besteht begleitend eine Kontakturtikaria bis hin zur generalisierten Urtikaria sowie eine fieberhafte Begleitreaktion.

Man unterscheidet:

→ die saisonale allergische Rhinopathie

Sie wird verursacht durch Pflanzenpollen und Konidien extramuraler Pilze.

→ die perenniale, nicht jahreszeitlich gehäuft auftretende allergische Rhinopathie

Sie wird verursacht durch häusliche (Hausstaubmilben, intramurale Pilze, Haustierepithelien) oder Arbeitsplatzallergene (z.B. Mehl-, Holz-, Medikamenten-, Pflanzenstäube).<sup>8</sup>

## 1.4. Pathophysiologie der Allergie

### 1.4.1. Die TH1/TH2-vermittelte Immunreaktion

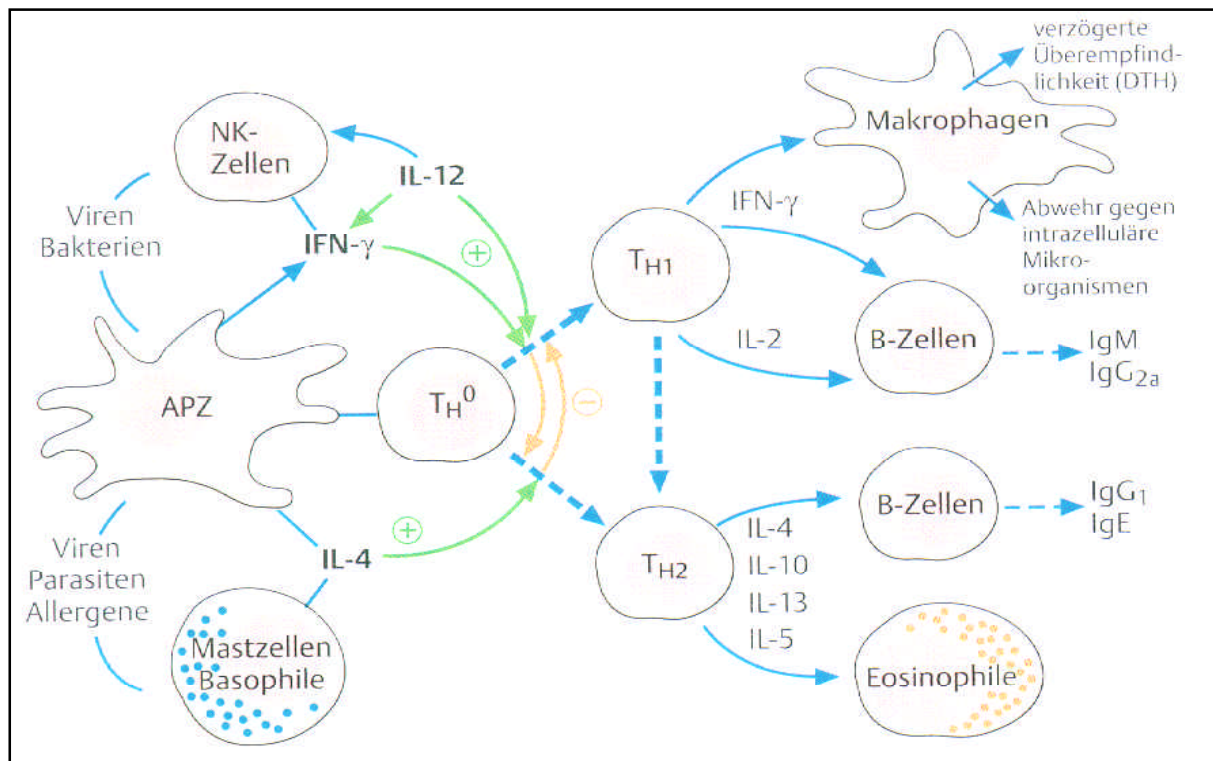
Das Immunsystem hat verschiedene Möglichkeiten auf ein Antigen zu reagieren. Durch die Art der Antigenpräsentation, die Menge des Antigens, die Lokalität der Antigenaufnahme, die Art der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) und vor allem durch das Zytokin-Milieu (freigesetzt durch die APC oder andere Effektorzellen der Entzündungsreaktion) sowie durch genetische Komponenten, wird der Reaktionstyp beeinflusst. Eine inadäquate Antwort kann zu Krankheiten führen. Ein wesentlicher Faktor für eine adäquate Immunantwort ist die Differenzierung unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen.<sup>1</sup>

Infektionen, vor allem durch Viren, Bakterien und Endotoxine, induzieren natürliche Killerzellen (NK) und eine T-Helferzell-1(TH1)-Antwort. Diese ist charakterisiert durch frühe Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion, erhöhte Phagozytentätigkeit und Elimination des Antigens durch IFN- $\gamma$ -aktivierte Makrophagen, sowie durch IgG2-Produktion, Bildung von komplementbindenden, opsonierenden Antikörpern und zytotoxische T-Zell-Antworten.<sup>2</sup> TH1-Zellen produzieren vor allem IFN- $\gamma$  und IL-12.<sup>9</sup> IL-12 fungiert dabei als wichtigster Förderer der TH1-Zellen und hemmt TH2-Zellen. Wurm- und viele andere Parasitenerkrankungen führen früh zu IL-4-Freisetzung und damit zur TH2-Antwort. TH2-Zellen rekrutieren eosinophile Granulozyten, induzieren IgG1 - und IgE-Antikörper.<sup>2</sup>

Allergiker und Atopiker leiden unter einer übermäßigen pathologischen TH2-Antwortbereitschaft. TH2-Zellen setzen vorwiegend IL-4, IL-5 und IL-13 frei. IL-4 und IL-5 sind wesentliche Faktoren für IgE-Produktion und Eosinophilie.<sup>2</sup> Das immunpathologische Kennzeichen der allergischen Erkrankungen ist die Infiltration von erkranktem Gewebe durch TH2-Zellen.<sup>10</sup> Die Immunantwort des neugeborenen Kindes wird von TH2-Zellen dominiert.<sup>11</sup> Später entwickelt sich das Immunsystem bei normalen nicht-atopischen Kindern zugunsten einer "Allergie-protektiven" TH1-Immunantwort. Bei den potentiell atopischen Kindern findet man eine dominierende TH2-Antwort.<sup>12</sup>

Abbildung 1 veranschaulicht die Pathogenese der TH1/TH2-vermittelten Immunreaktion.

Abbildung 1: Subpopulationen von T-Helferzellen<sup>2</sup>



### 1.4.2. Immunglobulin E (IgE)

Antikörper sind Immunglobuline (Ig), die von B-Lymphozyten und Plasmazellen gebildet werden. B-Lymphozyten tragen Immunglobuline als membranständige Antigenrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Plasmazellen können die Antikörper auch sezernieren. Jede Plasmazelle produziert einen bestimmten Antikörpertyp. Antikörper bestehen aus zwei schweren H-(Heavy-)Ketten und zwei leichten L-(Light-)Ketten. Der Typus der schweren Kette bestimmt die Einteilung in die Ig-Subklassen G, M, A, D und E. Die Leichtketten bestehen aus Kappa ( $\kappa$ )- oder Lambda ( $\lambda$ )-Ketten.<sup>13</sup> Immunglobulin E ist von Bedeutung für das Zustandekommen von allergischen Reaktionen. IgE ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 190 kDa und entspricht in verschiedenen physikalischen Eigenschaften den anderen Immunglobulinen. Es wird überwiegend in den Plasmazellen der Schleimhaut des Darms und des Respirationstraktes gebildet und ins Blut abgegeben. Der Mechanismus der allergischen Reaktion wird in Gang gesetzt, wenn sich das IgE-Molekül mit seinem Fc-Teil an FcεRI-Rezeptoren auf der Membran von Mastzellen und basophilen Leukozyten anlagert. Bei Kontakt mit spezifischen Allergenen, die vom IgE erkannt werden, setzen diese Zellen vasoaktive Amine frei, die Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp auslösen.<sup>14</sup> Ebenso kann die Mastzelldegranulation durch Parasiten ausgelöst werden.<sup>13</sup> Allergene enthalten in der Regel mehrere Aminosäuren- oder Eiweißstrukturen (Epitope), gegen die die IgE-Antikörper gerichtet sind. Die Antikörperbildung ist individuell unterschiedlich, so dass jeder Sensibilisierte sein eigenes Sensibilisierungsmuster aufweist (Allergoprint).<sup>6</sup>

*Tabelle 1 : Referenzwerte der IgE-Spiegel in Abhängigkeit vom Alter<sup>14</sup>*

Alter	IgE-Spiegel in U/ml im Serum
bis 1 Jahr	< 15 U/ml
1 Jahr bis 5 Jahre	< 60 U/ml
5 Jahre bis 9 Jahre	< 90 U/ml
9 Jahre bis 15 Jahre	< 200 U/ml
18 Jahre und älter	10 - 120 U/ml



Erhöhte Serum-IgE-Werte finden sich bei Erkrankungen des atopischen Formenkreises, beim Asthma bronchiale, bei Parasitosen, bei malignen Tumoren, beim Hyper-IgE-Syndrom (Job-Syndrom), beim Wiskott-Aldrich-Syndrom, bei der *Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR)* und beim IgE-Plasmozytom.

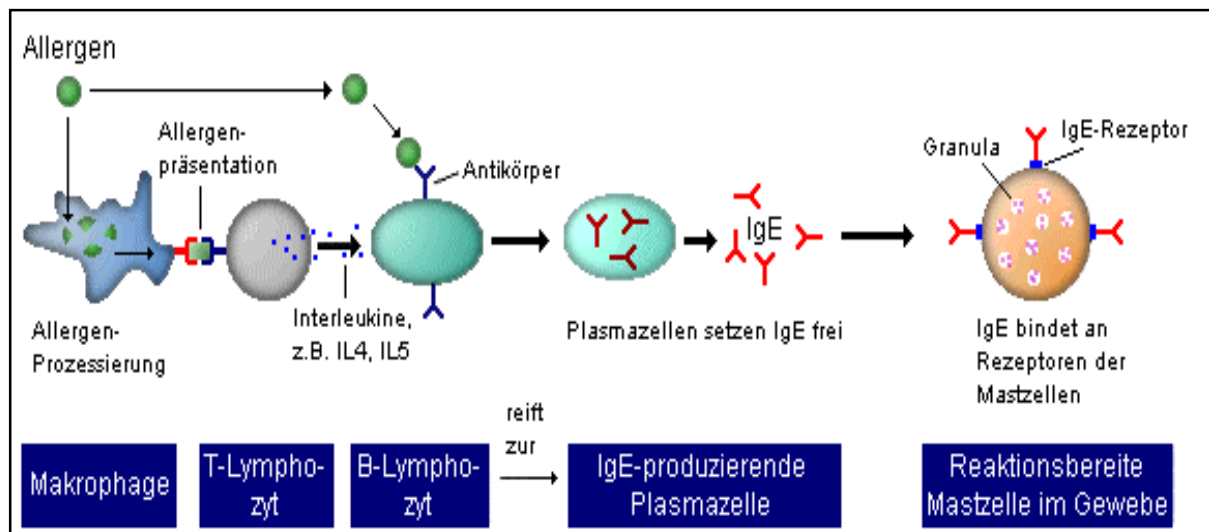
Erniedrigte Werte kommen bei fortgeschrittenen Neoplasien, bei der Ataxia teleangiectasia und manchmal auch bei Agammaglobulinämie vor.

Bei Nikotinabusus kann es zu falsch erhöhten Werten im Serum kommen. Patienten, die Phenytoin einnehmen, haben oft erniedrigte Werte.<sup>14</sup>

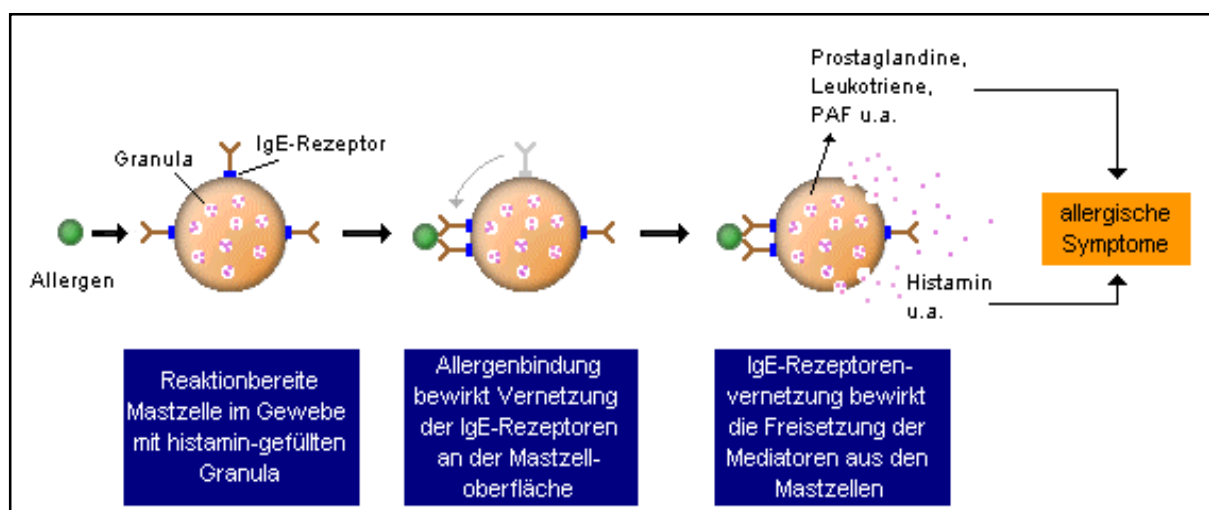
Abbildung 2 zeigt die Pathogenese von Typ I-Allergien.

Abbildung 2: Pathogenese von Typ I - Allergien<sup>15</sup>

### Schritt 1: Die Sensibilisierung des Immunsystems



### Schritt 2: Die Freisetzung der Mediatoren aus den Mastzellen verursacht die allergischen Beschwerden



## 1.5. Toll-like Rezeptoren

Alle lebenden Organismen werden ständig mit Mikroorganismen konfrontiert, die sich in der Umwelt befinden und in den Körper eindringen. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass das angeborene Immunsystem einen größeren Grad der Differenzierung aufweist als bisher angenommen, und in seiner Fähigkeit zwischen eigenen und fremden pathogenen Substanzen zu unterscheiden hoch entwickelt ist. Diese Fähigkeit beruht zu einem hohen Grad auf evolutionär konservierten Rezeptoren, den Toll-like Rezeptoren (TLR), die eine entscheidende Rolle in der frühen Verteidigung gegen eindringende Pathogene spielen. Sie gehören zur Klasse der Muster-Erkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*). Es gibt Hinweise, dass die frühe Aktivierung des angeborenen Immunsystems Voraussetzung ist für die Induktion des erworbenen Immunsystems, insbesondere der T-Helferzell 1 (TH1)-Antwort.<sup>16</sup>

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Homologe des Drosophila Gens TOLL. Sie erkennen hoch konservierte mikrobielle Struktur motive, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated microbial patterns*), die von mikrobiellen Erregern exprimiert werden. PAMPs sind verschiedenartige Komponenten der bakteriellen Zellwand, wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan (PGN), Lipopeptide, Flagellin, bakterielle DNA und virale einzel- und doppelsträngige DNA. Eine Stimulation von TLRs durch PAMPs startet eine Signalkaskade, die eine Zahl von Signalproteinen, wie MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) und IRAK1 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*), miteinbezieht. Diese Signalkaskade führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor  $\kappa$ B*), der die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Effektor-Zytokine veranlasst, die die entsprechende Immunantwort bestimmen. TLRs sind Transmembranproteine, die durch eine extrazelluläre leucinreiche Domäne und einen zytoplasmatischen Ausläufer, der eine konservierte Region, die Toll/IL1-Rezeptor (TIR)-Domäne, enthält, charakterisiert sind. TLRs werden hauptsächlich in Geweben des Immunsystems, wie Milz und Leukozyten, exprimiert. Sie werden aber auch in Geweben exprimiert, die mit der Umwelt in Verbindung stehen. Dies sind vor allem die Lunge und der Gastrointestinaltrakt.<sup>17</sup> Wie bereits erwähnt, spielen Toll-like Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Erkennung spezifischer mikrobieller Komponenten, die von pathogenen Mikroorganismen abstammen. Dies schließt Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren ein. Bisher sind beim Menschen 10 Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie bekannt. Die Toll-like Rezeptoren werden im folgenden kurz dargestellt:

TLR-2 erkennt bakterielle Lipoproteine. TLR-1 und TLR-6 heterodimerisieren mit TLR-2 und erkennen Diacyl- und Triacyl-Lipopeptide. TLR-2 bildet auch Homodimere aus. TLR-3 erkennt virale Doppelstrang-RNA. TLR-4 wird hauptsächlich durch Lipopolysaccharide aktiviert. TLR-5 erkennt bakterielles Flagellin.<sup>18</sup> Die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 erkennen kleine synthetische antivirale Moleküle sowie virale *single-stranded* RNA<sup>16, 19</sup>. Weiter erkennen sie Komponenten, die Imidazoquinolin enthalten. TLR-9 reagiert auf nichtmethylierte CpG-DNA Motive (CPG = Cytidin-Guanosin-Dinukleotide). TLR-10 ist vermutlich im menschlichen Organismus funktionell, während TLR-11 nur in der Maus funktionell ist. Im menschlichen Organismus existiert kein funktionsfähiges TLR-11. Es gibt Hinweise, dass ehemals humanes TLR-11 keine biologische Funktion innehatte und so evolutionär abhanden gekommen ist.<sup>18</sup> Durch die Fähigkeit der TLRs miteinander zu heterodimerisieren sowie mit anderen Wirtsproteinen Komplexe zu bilden, entsteht eine große Anzahl spezifischer Liganden für jeden Rezeptor.<sup>20</sup> So bilden MD2 (*LPS-bound Myeloid differentiation 2*) und CD14 als Antwort auf LPS einen Komplex mit dem TLR-4-Rezeptor.<sup>21</sup> Die individuellen Signalpfade der Toll-like Rezeptoren unterscheiden sich voneinander. Man unterscheidet zwischen MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalpfaden.<sup>18</sup> Der MyD88-abhängige Signalweg führt zur Rekrutierung von IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*). IRAK4 verbindet sich mit IRAK1 (*IL-1R-associated kinase 1*) und induziert die Phosphorylierung von IRAK1. TRAF6 (*Tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*) wird zum Rezeptorkomplex rekrutiert und bindet an phosphoryliertes IRAK1. Dies führt zur Aktivierung zweier Signalwege:<sup>16</sup>

Ein Weg führt über Aktivierung des I $\kappa$ B Kinase (IKK)-Komplexes zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Der andere Signalweg führt über Stimulation des Transkriptionsfaktors IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*) zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen.<sup>22</sup>

Der MyD88-unabhängige Pfad führt über TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN-b*) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*) und führt zur Stimulation von IFN- $\beta$ .<sup>16</sup>

Abbildung 3 und 4 veranschaulichen die Toll-like Rezeptor-Signalwege.

Abbildung 3: Signalwege der Toll-like Rezeptoren<sup>18</sup>

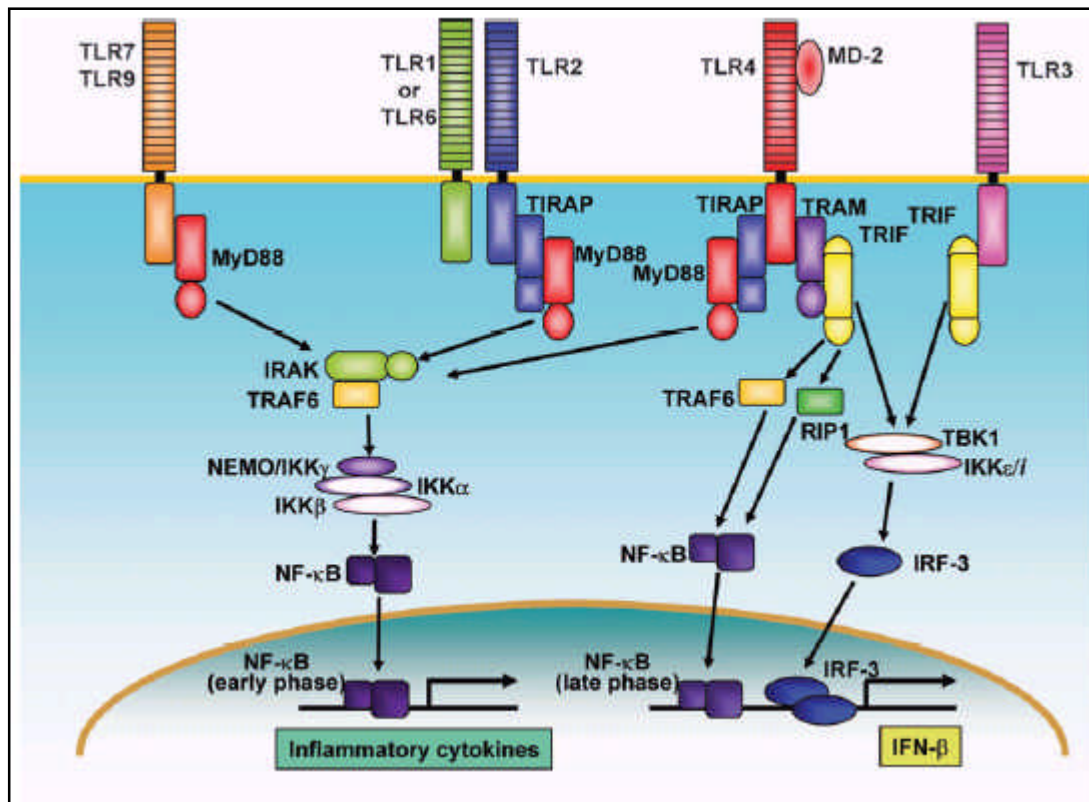
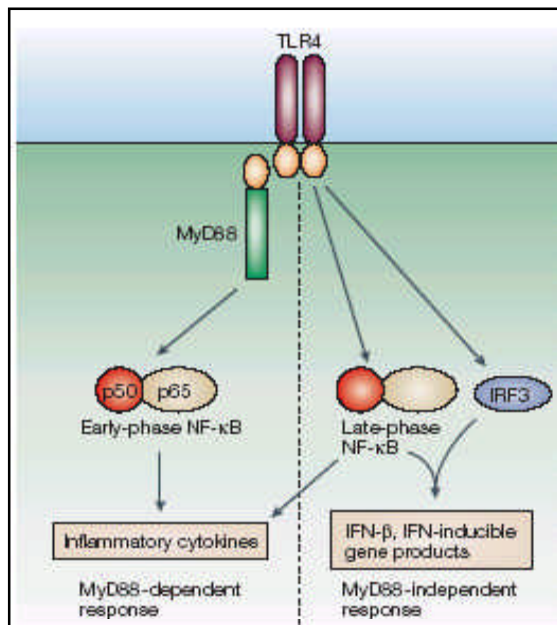


Abbildung 4: Der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige TLR-Signalweg<sup>16</sup>



## 1.6. Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein bedeutender Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Der auch als Endotoxin bezeichnete Molekülkomplex besteht aus dem Lipoid A, dem "Core"-Polysaccharid und der O-spezifischen Polysaccharidkette. Lipoid A ist für die toxische Wirkung verantwortlich. Als freie Substanz oder eingebunden in den Komplex LPS stimuliert es durch Makrophagen die Bildung und Sekretion von Zytokinen, die klinisch die Endotoxinsymptomatik bedingen. Interleukin 1 sowie der Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) induzieren eine gesteigerte Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Hypothalamus, wodurch der "Thermostat" im Temperaturzentrum auf eine höhere Temperatur eingestellt wird und Fieber resultiert. Weitere direkte und indirekte Folgen der Endotoxinwirkung sind Granulopoesestimulation, Aggregation von Thrombozyten, intravasale Gerinnung durch Aktivierung von Faktor VII, Blutdruckabfall, Kachexie. LPS kann auch das Komplementsystem auf dem alternativen Weg aktivieren. Wird viel Endotoxin frei, kann es zum septischen Schock (Endotoxinschock) kommen.<sup>2</sup>

LPS kann die IL-12-Produktion durch antigenpräsentierende Zellen (APC) stimulieren. Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die eine wichtige Rolle in der primären Reaktion auf Antigene und in der Festlegung der Differenzierung naiver T-Helferzellen in TH1- oder TH2-Zellen spielen. Bei Fehlen von IL-12 freisetzenden Faktoren können dendritische Zellen eine IL-4-Produktion in reifenden naiven T-Zellen induzieren. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass die Interleukin-12-Produktion durch dendritische Zellen ein obligatorisches Signal für die Differenzierung naiver T-Zellen in TH1-Zellen ist. CD14 dient als Rezeptor für bakterielles Endotoxin (LPS).<sup>23</sup> LPS bindet an das Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte CD14-Antigen. Die Bindung von LPS an diesen speziellen Rezeptor wird durch das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP) katalysiert.<sup>24</sup> LPS bildet mit dem Lipopolysaccharid-bindenden-Protein (LBP) den Lipopolysaccharid-Komplex.<sup>25</sup> Der Toll-like Rezeptor 4 erkennt LPS. Der Komplex aus CD14 und LPS wird dem TLR-4 präsentiert. Es kommt zur Komplexbildung mit MD2 und TLR-4.<sup>21</sup> TLR-4 benötigt MD2, um mit LPS interagieren zu können.<sup>26</sup>

## 1.7. CD14

CD14 ist ein leucinreiches Membranglykoprotein<sup>27</sup>, das aus 375 Aminosäuren besteht. Das CD14-Protein wird in zwei Exons codiert. Das Gen überspannt ca. 3900 Basenpaare.<sup>28</sup> Ein kurzes Intron trennt die beiden Exons.<sup>29</sup> CD14 ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 zwischen den Banden 5q23 bis q31 lokalisiert.<sup>30</sup> Genetische Kopplungsanalysen haben einige Kandidatengene für atopisches Asthma auf Chromosom 5q31-32 aufgedeckt. Dies sind neben CD14 IL3, IL4, IL5, IL9, IL12B, IL13 und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-*Colony stimulating factor*) sowie ADRB2 ( $\beta$ 2-Adrenorezeptor).<sup>29</sup>

CD14 ist ein Single-Copy-Gen. Das CD14-Protein kommt in zwei verschiedenen Formen vor: als 50 bis 55 kDa membranständiges CD14 (mCD14), das über eine Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Verankerung auf der äußeren Monozytenzellmembran gebunden ist, und als lösliches CD14 (sCD14), dem die GPI-Verankerung fehlt. mCD14 wird vor allem auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten exprimiert. Das lösliche CD14 (sCD14) wird von Monozyten und in der Leber gebildet. Es findet sich im normalen Serum in  $\mu$ g-Konzentrationen. mCD14 und sCD14 sind entscheidend für die LPS-abhängige Signalübermittlung.<sup>31</sup> Das membranständige CD14 dient als Rezeptor für bakterielles Endotoxin (LPS). LPS bildet mit dem Lipopolysaccharid-bindenden-Protein (LBP) den Lipopolysaccharid-Komplex.<sup>25</sup> LPS-reagible Zellen, denen mCD14 fehlt, wie Endothel- und Epithelzellen sowie Astrozyten, werden bei Vorhandensein von sCD14 schon für geringe Mengen LPS sensibilisiert.<sup>31</sup> LPS interagiert mit dem Lipopolysaccharid-bindenden-Protein (LBP) und CD14, um LPS dem Toll like-Rezeptor 4 zu präsentieren.<sup>32</sup> Der Toll-like Rezeptor 4 spielt eine wichtige Rolle in der LPS-induzierten Signalübermittlung.<sup>24</sup> CD14 erkennt apoptotische Zellen und veranlaßt ihre Abräumung durch Makrophagen. Dabei kommt es nicht zu einer Entzündungsreaktion, da apoptotische Zellen nicht zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen führen.<sup>33</sup>

## 1.8. Die Hygiene-Hypothese

Der Begriff der "Hygiene-Hypothese" wurde 1989 von Strachan<sup>34</sup> geprägt. Die im folgenden beschriebenen Phänomene beschreiben die Theorie der „Hygiene-Hypothese“. Deutlich verbesserte Hygieneverhältnisse haben Einfluss auf die mikrobielle Umwelt eines neugeborenen Kindes. Hierdurch wird die postnatale Entwicklung des Immunsystems beeinflusst, was zu einer gesteigerten Prädisposition für allergische Erkrankungen während der Kindheit führt.<sup>23</sup>

Der Anstieg in der Prävalenz atopischer Erkrankungen im westlichen Europa, den USA und Australasien während der letzten Jahre weist auf die Bedeutung von Umwelteinflüssen hin.<sup>10</sup> Ein Beispiel ist die Veränderung in der Inzidenz der saisonalen allergischen Rhinitis und des Asthma bronchiale nach der Wiedervereinigung Deutschlands. Diese Funktionsstörungen waren vor der Wiedervereinigung weniger häufig in Ostdeutschland als in Westdeutschland.<sup>35</sup> Seit der Wiedervereinigung ist die Prävalenz von Atopie und Heuschnupfen bei Kindern in Ostdeutschland angestiegen.<sup>36</sup> Diese Beobachtung wirft die Möglichkeit auf, dass ein westlicher Lebensstil für den Anstieg der Prävalenz verantwortlich ist. In westlichen Ländern ist das sich entwickelnde Immunsystem weniger exponiert gegenüber mikrobiellen Antigenen, die TH1-Zellen stimulieren. Grund dafür ist die relativ saubere Umwelt und der weitverbreitete Gebrauch von Antibiotika schon bei leichten Erkrankungen im frühen Lebensalter.<sup>10</sup>

Epidemiologische Studien unterstützen diese Hypothese. Anhaltspunkte, dass Bakterien, die den Darm besiedeln, protektiv auf die Entstehung von Allergie und Atopie wirken können, wurden in einer Studie gefunden, in der einjährige Kinder in Estland, einem Land mit niedriger Prävalenz für Allergien, und Schweden, einem Land mit hoher Prävalenz für Allergien, auf den bakteriellen Darmbesatz hin untersucht wurden. Lactobacillus und Eubakterien herrschen bei estländischen Kindern vor. Schwedische Kinder wiesen mehr Clostridien auf. Bei einer Untersuchung ein Jahr später, stellte sich heraus, dass die Kinder mit Atopie weniger Lactobacillus aufwiesen, dafür aber mehr coliforme Bakterien und Staphylococcus aureus, als Kinder ohne atopische Erkrankung.<sup>10</sup> Allergische Erkrankungen sind ebenfalls seltener bei Kindern mit drei oder mehr älteren Geschwister sowie bei Kindern, die Kinderkrankheiten durchgemacht haben. Diese Beobachtung wird von Ball et al. unterstützt, die beobachtet haben, dass das Vorhandensein älterer Geschwister bzw. das Zusammensein mit anderen Kindern in Kindertagesstätten vor der Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale schützt.<sup>37</sup>

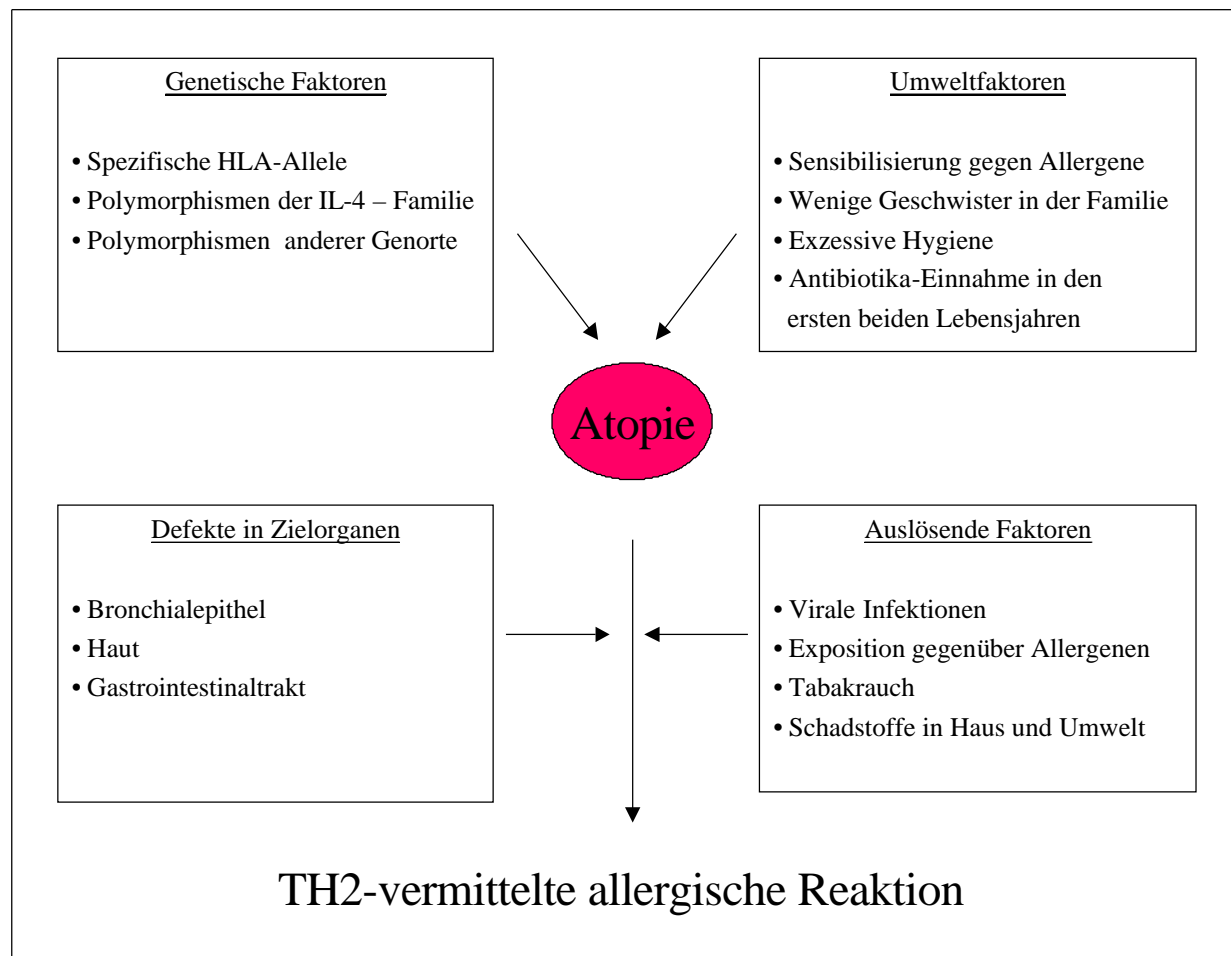
Eine Querschnittsstudie aus ländlichen Gebieten Österreichs, Deutschlands und der Schweiz zeigt, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind, ein geringeres Risiko aufweisen allergische Erkrankungen zu entwickeln. Eine wichtige protektive Rolle spielt dabei der Kontakt zu Tieren.<sup>38</sup> Regelmäßiger Umgang mit dem Viehbestand und dem Geflügel eines Hofes, schon in früher Kindheit, soll eine protektive Wirkung auf die Entstehung von allergischen Erkrankungen haben.<sup>39</sup>

Auf Bauernhöfen wurden im Staub von Küchenböden und Kindermatratten höhere Konzentrationen von Endotoxin (Lipopolysaccharid von der Zellwand gramnegativer Bakterien) gefunden als in anderen Haushalten. Endotoxin und andere mikrobielle Komponenten regulieren verschiedene Prozesse im Immunsystem, beispielsweise die Produktion von IL-12 und Interferon  $\gamma$ . Diese Faktoren unterdrücken eine TH2-gesteuerte Immunantwort und wirken auf diese Weise gegen eine allergische Sensibilisierung.<sup>38</sup> Lipopolysaccharid wird durch CD14 an den TLR-4 Rezeptor gebunden. Findet ein vermehrter Kontakt zu LPS in der Kindheit statt, so kommt es möglicherweise auch zu vermehrter CD14-Produktion. CD14-vermittelte Reaktionen auf LPS führen zur verstärkten Expression von IL-12 und IL-18.<sup>40</sup> Es gibt Hinweise, dass die IL-12-Produktion durch dendritische Zellen ein obligatorisches Signal für die Differenzierung naiver T-Zellen in reife TH1-Zellen darstellt.<sup>23</sup> Die Erkenntnisse der Hygiene-Hypothese unterstützen die Annahme, dass CD14 ein Kandidatengen in der Pathogenese von Atopie und Asthma darstellt und eine wichtige Rolle in der Allergieprotektion spielt.<sup>41</sup>

Abbildung 5 stellt Faktoren dar, die die Entwicklung einer TH2-vermittelten allergischen Reaktion beeinflussen.



Abbildung 5: Faktoren, die die Entwicklung einer TH2-vermittelten allergischen Reaktion beeinflussen<sup>10</sup>



## 1.9. CD14 als Kandidatengen atopischer Erkrankungen

CD14 dient als Rezeptor für bakterielles Endotoxin (LPS) und bildet mit dem Lipopolysaccharid-bindenden-Protein (LBP) den Lipopolysaccharid-Komplex.<sup>25</sup> Die Induktion der wesentlichen Mediatoren wird durch den sogenannten Toll/CD14 Rezeptorkomplex vermittelt.<sup>42</sup> Toll-like Rezeptor 4 ist der wesentliche Rezeptor für die Erkennung und Signaltransduktion von LPS. Die Signaltransduktion für LPS wird durch TLR-4 vermittelt, nachdem das LPS-Binding-Protein (LBP) an den CD14-Rezeptor gebunden hat und somit eine funktionelle Einheit zwischen dem CD14 Rezeptor und dem TLR-4 bildet.<sup>25</sup> Diese Verbindung löst eine Signalkaskade aus, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führt, welches die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α (Tumor-Nekrose-Faktor α), IL-1 und IL-12p70 induziert. IL-12 und IFN-γ aktivieren TH1-Zellen.<sup>2</sup> TH1-Zellen bilden nach der Aktivierung durch antigen-präsentierende Zellen hauptsächlich Zytokine, die B-Zellen zu IgG-produzierenden Plasmazellen reifen lassen. Auf diese Weise wird eine Immunität gegenüber dem Fremdstoff aufgebaut.<sup>15</sup>

Allergiker und Atopiker leiden unter einer übermäßigen pathologischen TH2-Antwortbereitschaft.<sup>2</sup> TH2-Zellen setzen vorwiegend IL-4 und IL-5 frei. IL-4 und IL-5 sind wesentliche Faktoren für IgE-Produktion und Eosinophilie. Das immunpathologische Kennzeichen der allergischen Erkrankungen ist die Infiltration von erkranktem Gewebe durch TH2-Zellen.<sup>10</sup> Da CD14 an zentraler Stelle der LPS-vermittelten TH1-Prägung der Immunantwort steht, sind Varianten des CD14-Gens mit atopischen Erkrankungen assoziiert worden.

Baldini et al.<sup>43</sup> untersuchten 481 Kinder aus der *Tucson Children's Respiratory* - Studie (CRS) im Alter von 11 Jahren und identifizierten einen SNP (*single nucleotide polymorphism*) in der proximalen CD14-Promotorregion. An Position -159 wurde in der Promotorsequenz ein SNP nachgewiesen, der sich durch das Auftreten der Basen Thymin und Cytosin darstellte. Die Allelfrequenz für Cytosin betrug 51,4 %, die für Thymin 48,6%.

Die IgE-Spiegel im Serum derselben Probanden wurden ermittelt. TT-homozygote Probanden wiesen signifikant niedrigere IgE-Spiegel auf als Träger der anderen Genotypen. Die Assoziation war nur bei denjenigen Kindern signifikant, die im Vorfeld, bei der Hauttestung auf lokale Aeroallergene, positiv getestet wurden.

Die sCD14-Spiegel im Serum wurden bei 67 CC-homozygoten Probanden und bei 42 TT-homozygoten Probanden bestimmt. TT-Homozygote hatten signifikant höhere sCD14-Spiegel als Träger der anderen Genotypen ( $p = 0,01$ ).

Baldini et al. vermuteten daher, dass die CD14-159C>T (rs2569190)-Promotormutation eine wichtige Rolle bei der Regulation der sCD14- und IgE-Spiegel im Serum spielt und CD14 ein Kandidatengen für atopische Erkrankungen darstellt.

Vercelli, Baldini et al.<sup>44</sup> sequenzierten die 5'-Region des CD14 Gens und beschrieben vier weitere SNPs an den Positionen -1619, -1359, -1145 und -809. Das Probenmaterial stammte ebenfalls aus der *Tucson Children's Respiratory* - Studie (CRS). Die CD14-Genotypen wurden mit den sCD14- und IgE-Spiegeln im Serum assoziiert. Träger der CD14-1359T/-1145A/-159C-SNPs hatten signifikant höhere IgE-Spiegel als jede andere Gruppe sowie die niedrigsten sCD14-Spiegel im Serum. Die höchsten sCD14-Spiegel und niedrigsten IgE-Werte wurden bei Trägern der CD14-1359G/-1145G/-159T-SNPs gefunden.

In der Folgezeit sind zahlreiche Studien zur Assoziation von CD14-Genvarianten mit Atopie-Phänotypen publiziert worden. Sie zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Diese Studien werden später ausführlich diskutiert.

## 1.10. Zielsetzung

Die Allergie ist Folge einer ererbten Überempfindlichkeit des Immunsystems auf normalerweise harmlose Umweltstoffe (Allergene). Die genetischen Grundlagen dieser polygenen Erkrankung sind noch weitgehend unbekannt. Genomweite Segregationsanalysen zeigten übereinstimmend eine Kopplung der chromosomalen Region 5q31 mit Asthma und anderen allergiebezogenen Phänotypen. Ein wichtiges Kandidatengen in dieser Region ist CD14, das eine entscheidende Funktion als Co-Rezeptor für bakterielles LPS hat. CD14 übermittelt LPS an den TLR-4-Rezeptorkomplex antigenpräsentierender Zellen mit nachfolgender T-Zell-Differenzierung zugunsten der allergieprotektiven TH1-Immunantwort. CD14 gilt daher als wichtiges Kandidatengen für allergische Erkrankungen. Genetische Assoziationsstudien beschrieben eine Assoziation eines SNP in der CD14 Promotorregion (CD14-159C>T (rs2569190)) mit verschiedenen relevanten Phänotypen. Mehrere Folgestudien zeigten allerdings widersprüchliche Ergebnisse.

Allergische Erkrankungen nehmen stetig in der Bevölkerung zu. Neben hohem Leidensdruck für die betroffenen Personen, verursachen diese Erkrankungen hohe Kosten, die das Gesundheitssystem belasten. Eine umfassende Klärung der Pathogenese der Allergie ist wichtig, um durch präventive Maßnahmen bei gefährdeten Personen frühzeitig ein Auftreten von Krankheitssymptomen zu verhindern oder diese abzumildern. Aus diesem Grund soll in dieser Studie durch ein stringentes Konzept bei der Studienplanung ein repräsentatives Ergebnis vorgelegt werden. In dieser Arbeit sollte im Rahmen einer genetischen Assoziationsstudie eine systematische Kartierung der CD14-Promotorregion vorgenommen werden. Die Genvarianten CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191), CD14-1359G>T (rs3138078) und CD14+1443T>G (rs2563298) sollten sowohl mit quantitativen intermediären Phänotypen (Serum sCD14-Spiegel, Serum IgE-Spiegel) als auch distalen allergischen Phänotypen (Anamnesedaten) assoziiert werden. Das Studienkonzept sah eine explorative Untersuchung an 200 Probanden vor. Positive Ergebnisse (Irrtumswahrscheinlichkeit < 5%, ohne Bonferroni-Korrektur) sollten in einer zweiten, unabhängigen Replikationsstudie mit höherer Fallzahl ( $n > 500$ ) bestätigt werden. Bei einer ausreichend hohen Fallzahl ist es sehr wahrscheinlich, eine vorhandene Assoziation in einer Population aufzuzeigen. Da es sich um ein homogenes Kollektiv aus deutschen Probanden handelt, sind Diskrepanzen durch ethnische Einflüsse nicht zu erwarten.

Die Arbeitshypothesen dieser Studie lauten: CD14 spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Allergie. Der CD14-159C>T Promoterpolymorphismus hat Einfluss auf die Regulierung der IgE- und sCD14-Spiegel im Serum.

## 2. MATERIAL, PROBANDEN UND METHODEN

### 2.1. Geräte, Kleinmaterial und Reagenzien

#### 2.1.1. Geräte

<i>Digital video documentation for gels:</i>	Intas, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresegerät Consort E 863:	Biometra, Deutschland
Elektrophoresekammer:	Keutz, Reiskirchen, Deutschland
Feinwaage:	Mettler AE100, Giessen, Deutschland
Magnetrührer:	Ikamag RET, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Mikrowelle:	Siemens, München, Deutschland
Photometer:	Spekol UV Vis, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetus:	Hirschmann® EM Techcolor, Eberstadt, Deutschland
Pipetten:	0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sequenziergerät:	ABI-PRISM™310 <i>Genetic Analyzer</i> , Perkin Elmer, Langen, Deutschland
Sofortbildkamera:	Technorama, Fernwald, Deutschland
Spannungsquelle:	PHERO-Stab 500, Biotec Fisher, Nidderau, Deutschland
Spektralphotometer:	Firma Zeiss, Stuttgart, Deutschland
TRIO-Thermoblock:	Biometra, Göttingen, Deutschland
<i>Thermocycler:</i>	Gene®Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Langen, Deutschland
Vakuumpumpe <i>VakuGene Pump</i> :	Pharmacia LKB Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Vakuumzentrifuge:	Speed-Vac, Keutz, Reiskirchen, Deutschland
Vortex:	Heidolph REAX 2000, Deutschland
Zentrifugen:	Mikro 20, Typ 2004 und Rotixa/A, Hettich, 78532 Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.2. Kleinmaterial

Becherglas:	500 ml (Fa. Falcon, Heidelberg)
<i>Blue cap tubes:</i>	15 ml und 50 ml, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, France
Einfrierampullen <i>cryo tubes:</i>	Fa. Nunc
Gelschlitten:	5 cm x 7,5 cm und 10 cm x 15 cm, Keutz, Reichskirchen, Deutschland
Glaswaren:	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Messkolben:	1 l, Fa. Roth
Messzylinder:	50 ml, Fa. Roth
Mikrotiterplatte:	96 Loch, Fa. Greiter, Nürtingen
PCR-Strips:	0,2 ml, Firma Biozym
Pipettenspitzen:	10 µl, 100 µl, 1000 µl, Firma Biozym
Pipettenspitzen:	Filtertips 10 µl, 100 µl, 1000 µl, ART Molecular Bio-Products Inc., San Diego, USA
Polaroidfilm:	Typ 667, Firma Polaroid, Hertfordshire, England
Reaktionsgefäße:	<i>Safe Seal Microcentrifuge Tubes</i> , 0,65 ml und 1,7 ml, Bioscience, Salt Lake City, Utah, USA
Sequenziergefäße:	0,5 ml, <i>Genetic Analyzer Sample Tubes</i> , ABI PRISM, Perkin Elmer, Langen

### 2.1.3. Reagenzien:

<i>ABI Prism® Big Dye™ Terminator</i> <i>Cycle Sequencing Ready Reaction Kit:</i>	Applied Biosystems, Warrington, UK
Agarose NA:	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
<i>AmpliTaQ® Gold Polymerase:</i>	Perkin Elmer, New Jersey, USA

<i>Aqua ad iniectabilia:</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
<i>Aqua dest.:</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
Bromphenolblau:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsstandard:	100 bp DNA Ladder, BioLabs, New England
Eisessig:	Essigsäure 100%, Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>ELISA soluble CD14 Immunoassay:</i>	Quantikine®, USA
Ethanol absolut:	Riedel-de-Haen®, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA):	Merck, Darmstadt, Deutschland
Genomic DNA Isolation Kit:	Puregene®, Gentra Systems, Minneapolis, USA
Isopropanol:	2-Propanol, Riedel-de-Haen®, Seelze, Deutschland
Natriumacetat pH 4,6:	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Oligonukleotid-Primer:</i>	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
<i>Puregene DNA Isolation Kit:</i>	Gentra Systems Inc., Minneapolis, USA
Saccharose reinst:	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Taq-Puffer (10x):</i>	Perkin Elmer, New Jersey, USA
<i>Template Suppressor Reagent (TSR):</i>	Applied Biosystems, Warrington, UK
Trishydroxymethylaminomethan (Tris):	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Ultrapure dNTP-Set:</i>	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

#### **2.1.4. Puffer und Lösungen**

50x TAE:	1.242 g Tris ad 1 Liter Aqua dest. 100 ml 0,5M-EDTA (pH 8,0) 30 min bei 37 °C rühren 57,1 ml Eisessig pH-Wert 7,2 bei Gebrauch 100 µl 0,5M-EDTA dazugeben
----------	--



Ladepuffer:	4g Saccharose
	25 mg Bromphenolblau
	ad 9 ml Aqua dest.
	aliquotieren in 900 µl-Portionen
	bei –20°C einfrieren
	bei Gebrauch 100 µl 0,5M-EDTA dazugeben

### **2.1.5. Computerprogramme**

Arlequin:	Genf, Schweiz
Blast:	Basic local Alignment Search Tool; ©EBI 2000
Gene Bank:	National Library of Medicine
GeneDoc:	Version 2.6.001; ©2000 by Karl Nicholas
MS Power Point:	Microsoft, USA
Oligo:	Version 4.0, Med Probe, Oslo, Norwegen
PubMed:	National Library of Medicine
SPSS:	Version 9.0 - 12.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA
TRANSFAC:	Version 4.0, MatInspector V2.2, GBF-Braunschweig 2001

## **2.2. Probanden**

### **2.2.1. Blutspender**

Das periphere Blut für die erste explorative Studie stammt von 200 freiwilligen Blutspendern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Giessen. Ausschlusskriterien für diese Probanden waren:

- a. eine vorangegangene Spezifische Immuntherapie (SIT)
- b. eine Verwandtschaft ersten Grades innerhalb der Probandengruppe

Eine Verwandtschaft 1. Grades wurde anhand einer geführten Namensliste sowie durch Befragung der Probanden ausgeschlossen. Anamnestische und laborchemische Kriterien dienten zur Bestimmung des atopischen Phänotyps. Die Standard-Atopieanamnese unter ärztlicher Anleitung beinhaltete Fragen nach typischen allergischen Erkrankungen wie Heuschnupfen, Hausstauballergie, allergisches Asthma bronchiale und atopisches Ekzem bei den Probanden selbst sowie bei deren Verwandten ersten Grades (Eltern und Geschwister). Weiter wurde nach ärztlicher Diagnostik und Medikamenteneinnahme gefragt. Als intermediäre Phänotypen wurden Gesamt-IgE-Werte und spezifische IgE-Tests gegen die häufigsten Inhalationsallergene bestimmt. Die Anwesenheit spezifischer IgE-Antikörper wurde mit dem Phadiatop SX1-Test bestimmt. Die Allergene dieses Tests umfassen Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Hausstaub, Katzen- und Hundeschuppen und *Cladosporium herbarum*.

In einer Replikationsstudie wurden 690 Probanden untersucht. Für alle Probanden wurde der IgE-Wert im Serum bestimmt. Eine spezielle Allergieanamnese anhand eines Fragebogens wurde bei diesen Probanden nicht durchgeführt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Kollektiv ebenso wie die explorative Studie Probanden einschließt, die eine allergische Disposition aufweisen.

Alle durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Gießen genehmigt.

### **2.2.2. Kinder aus der ISAAC-Studie**

In Kooperation mit einer Münchener Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Michael Kabesch aus der Universitätskinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden Proben von Kindern bereitgestellt, die im Rahmen der ISAAC-Studie<sup>45</sup> (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) rekrutiert wurden. Im Rahmen dieser Studie wurden Kinder aller Altersklassen in Dresden und München untersucht. Die Kinder mussten deutschen Ursprungs sein. Es wurde eine Hauttestung auf Allergene durchgeführt und der IgE-Spiegel im Serum bestimmt. Die Eltern gaben in einem Fragebogen an, ob ihre Kinder an Asthma, allergischem Schnupfen oder atopischem Ekzem leiden. Kinder, deren Eltern über ein ärztlich diagnostiziertes Asthma bronchiale berichteten, wurden als Asthmatiker eingestuft. Allergischer Schnupfen bzw. atopisches Ekzem wurden ebenfalls als manifeste Erkrankung protokolliert, wenn die Eltern von einer ärztlichen Diagnose berichteten. Die Kinder wurden in die Studie aufgenommen, wenn sie mindestens eine allergische Erkrankung (Asthma bronchiale, Atopisches Ekzem und/oder Allergische Rhinitis) aufwiesen.

Das Kollektiv schloss 170 Kinder im Alter von 10 Jahren aus Dresden sowie 186 Kinder im Alter von 10 Jahren aus dem Raum München ein. Im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Giessen wurde für diese Probanden der sCD14-Spiegel im Serum bestimmt.

## 2.3. Methoden

### 2.3.1. DNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Die Blutproben wurden entweder frisch oder nach maximal dreitägiger Lagerung bei 4°C verarbeitet. Die DNA der peripheren Blutleukozyten wurde mit Hilfe des *Puregene DNA isolation kit* nach Herstelleranleitung isoliert. Die DNA wurde dabei mittels Zelllysierung durch anionische Detergentien freigelegt und durch im Ansatz befindliche DNase-Hemmstoffe vor Verdauung geschützt.

RNA, die aus dem Ansatz entfernt werden sollte, wurde durch RNAsen gespalten und die Proteine wurden durch Salzfällung von der DNA getrennt. Diese wurde nach Alkoholpräzipitation in einer Pufferlösung aufgenommen. Die Proben wurden weiterverarbeitet und anschließend bei -25°C eingefroren.

Die Konzentration der in *Aqua dest.* gelösten DNA wurde durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260\text{ nm}}$ ,  $OD = \text{Optical Density}$ ) im UV-Spektralphotometer bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einem Extinktionsmaximum von 260 nm entsprach bei einer Schichtdicke der Meßküvette von 1 cm einem Gehalt von 50 µl/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient aus der gemessenen Extinktion bei 260 nm und 280 nm ( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ ) erlaubte eine Aussage über die Kontamination der Probe. Ein Wert kleiner als 1,8 galt als ein Indiz für eine übermäßige Verunreinigung mit Proteinen.

Die Proben wurden mit *Aqua dest.* auf einen Wert von 10 µg/ml bzw. 5 µg/ml verdünnt.

### 2.3.2. Oligonukleotid-Primer

Um DNA mit Hilfe einer PCR (*polymerase chain reaction*) amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonukleotidprimer. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (*template*) gewählt werden.

Bei der Wahl der *Primer* sollte man folgende Punkte beachten:

- die Primer sollten in der Regel 20 bis 30 Nukleotide lang sein
- nach Möglichkeit sollten alle vier Basen gleich häufig vertreten sein
- Bereiche mit ungewöhnlichen Sequenzabschnitten aus Polypurin, Polypyrimidin oder sich wiederholenden Motiven sind zu vermeiden
- Bereiche mit ausgeprägter Sekundärstruktur sind zu vermeiden
- Primerpaare sollten an ihren 3'-Enden weder inter- noch intramolekular komplementär sein, da sich Primerdimere ausbilden können

Ein wichtiger Faktor bei der Wahl der *Primer* ist die Schmelztemperatur ( $T_m$ ). Für jede Amplifizierung konstruiert man die Primerpaare möglichst so, dass beide *Primer* eine ähnliche  $T_m$  haben. Zur Berechnung wird folgende Gleichung benutzt, die jedoch für *Primer*, die länger als 20 Nucleotide sind, ungenau ist:

$$T_m = [(Anzahl \text{ von } A + T) \times 2^\circ C + (Anzahl \text{ von } G + C) \times 4^\circ C]$$

Zur Bestimmung der Schmelztemperaturen, Sekundärstrukturen und möglicher Primerdimere der verwendeten Oligonukleotide wurde das Computerprogramm OLIGO genutzt, da es eine einfache und schnelle Methode zur PCR-*Primer*-Analyse darstellt.

### 2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann.

Eine Denaturierungsphase, eine *Primer*-Anlagerungsphase (*Annealing*) und eine Elongationsphase bilden einen Zyklus, der je nach DNA-Ausgangskonzentration und Primerbedingungen bis zu vierzigmal wiederholt wird.

Der zyklische Temperaturverlauf der PCR stellt sich folgendermaßen dar<sup>46</sup>:

1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA

Die doppelsträngige DNA wird in einer Lösung mit *Primern*, den vier freien Desoxynucleotid-Triphosphaten (dNTPs), dem Reaktionspuffer und einer hitzestabilen DNA-Polymerase durch Hitze denaturiert und in Einzelstränge geschmolzen. Die Temperatur für diesen Schritt liegt normalerweise bei 93-100°C.

2. *Primer*-Anlagerung („*Annealing*“)

Die Oligonucleotidprimer binden an die komplementäre Sequenz der denaturierten Matrize, wenn man die Temperatur in Abhängigkeit von der  $T_m$  der Oligonucleotidprimer auf 37-65 °C absenkt.

3. *Primer*-Extension

Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die *Primer* bei 72°C durch Hinzufügen komplementärer Nucleotide in 5'-3'-Richtung.

Das Ziel der PCR ist eine Verdopplung der Matrizen je Zyklus. Nach 20 bis 30 Zyklen können kleinste DNA-Mengen millionenfach vervielfältigt werden.

#### 2.3.4. PCR mit sequenzspezifischen Primern (SSP-PCR)

Zur Untersuchung der SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) eines Gens wurde die SSP-PCR (SSP = *sequence specific primer*) eingesetzt. Die SSP-PCR basiert darauf, dass *Primer* nur dann eine Vervielfältigung der Zielsequenz ermöglichen, wenn sie sich komplementär anlagern können und insbesondere ihr 3'-Ende exakt komplementär ist. Daher werden sequenzspezifische *Primer* eingesetzt, bei denen das 3'-Ende eines *Primers* entweder für den Wildtyp oder für die mutierte Form spezifisch ist. Voraussetzung für die Amplifikation ist die vollständige Komplementarität von *Primer* und *Template*-DNA. Als interne Positivkontrolle dienen in jedem Reaktionsansatz CRP-*Primer* (CRP = C-reaktives Protein). Als Negativkontrolle wird ein Ansatz mitgeführt, der anstelle von DNA nur H<sub>2</sub>O enthält. Ferner wurden in jeder Untersuchungsserie für jeden Genotyp bekannte homozygote DNA-Proben als externe Kontrolle mitgeführt.

Die Genotypisierung der CD14-SNPs erfolgte nach folgendem Protokoll:

Ein PCR-Reaktionsansatz enthielt 5 µl genomische DNA (10-15 ηg/µl), 1,66 µl *Mastermix*, 4,9 µl 1x*Taq*-Puffer, 0,16 µl *AmpliTaQ<sup>®</sup> Gold-Polymerase* (5 U/µl) und je 1 µl der sequenzspezifischen Primer (10 pmol/µl). Das Volumen wurde mit *Aqua ad iniectabilia* auf 20 µl eingestellt. Das Mastermix bestand aus 300 µl 10x *Taq*-Puffer und je 8 µl dATP, dCTP, dGTP und dTTP (0,2 mmol/l). Für die Amplifikation wurde der 10x *Taq*-Puffer zu 1x *Taq*-Puffer verdünnt. Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

*Tabelle 2: Programm der SSP-PCR*

95°C	10 min	Denaturierung der DNA
10 Zyklen:		
95°C	30 sec	Denaturierung der DNA
65°C	60 sec	kombiniertes <i>Annealing</i> und Extension
22 Zyklen:		
95°C	30 sec	Denaturierung
61°C	50 sec	<i>Annealing</i>
72°C	40 sec	Extension

*Tabelle 3: Allel- und genspezifische Primer für die SNPs der CD14-Genregion*

SNP	Primer	Sequenz von 5'-3'	Produktlänge (bp)
CD14-159C>T	CD14-159T	AGA ATC CTT CCT GTT ACG GT	163
	allelspezifische Primer	CD14-159C	
	genspezifischer Primer	CD14-159com	
CD14-1145A>G	CD14-1145A	CTG TTT TTG TCT GTT TTT TGC A	175
	allelspezifische Primer	CD14-1145G	
	genspezifischer Primer	CD14-1145com	
CD14-1359G>T	CD14-1359G	TCA CGC CAC TGC ACT CCA G	243
	allelspezifische Primer	CD14-1359T	
	genspezifischer Primer	CD14-1359com	
CD14+1443T>G	CD14+1443T	TTA AAA TCT TAA ACA ACG GT	144
	allelspezifische Primer	CD14+1443G	
	genspezifischer Primer	CD14+1443com	

*Tabelle 4: Sequenzierprimer der CD14-Genregion*

SNP	Primer	Sequenz von 5'-3'	Produktlänge (bp)
CD14-159C>T	Upstream-Primer	GCC TGA GTC ATC AGG ACA CT	183
	Downstream-Primer	TCA TCC AGT TCC CTC CTC TG	
CD14-1145A>G	Upstream-Primer	GAA TCT GAG GCA AGA GAA TTG	361
	Downstream-Primer	AAT CTC TGT GCC CTA GGA AG	
CD14-1359G>T	Upstream-Primer	GAA TCT GAG GCA AGA GAA TTG	361
	Downstream-Primer	AAT CTC TGT GCC CTA GGA AG	
CD14+1443T>G	Upstream-Primer	GTG GAT AAC CTG ACA CTG GAC	354
	Downstream-Primer	AGT ACT GTG CCC AGC ACA TA	



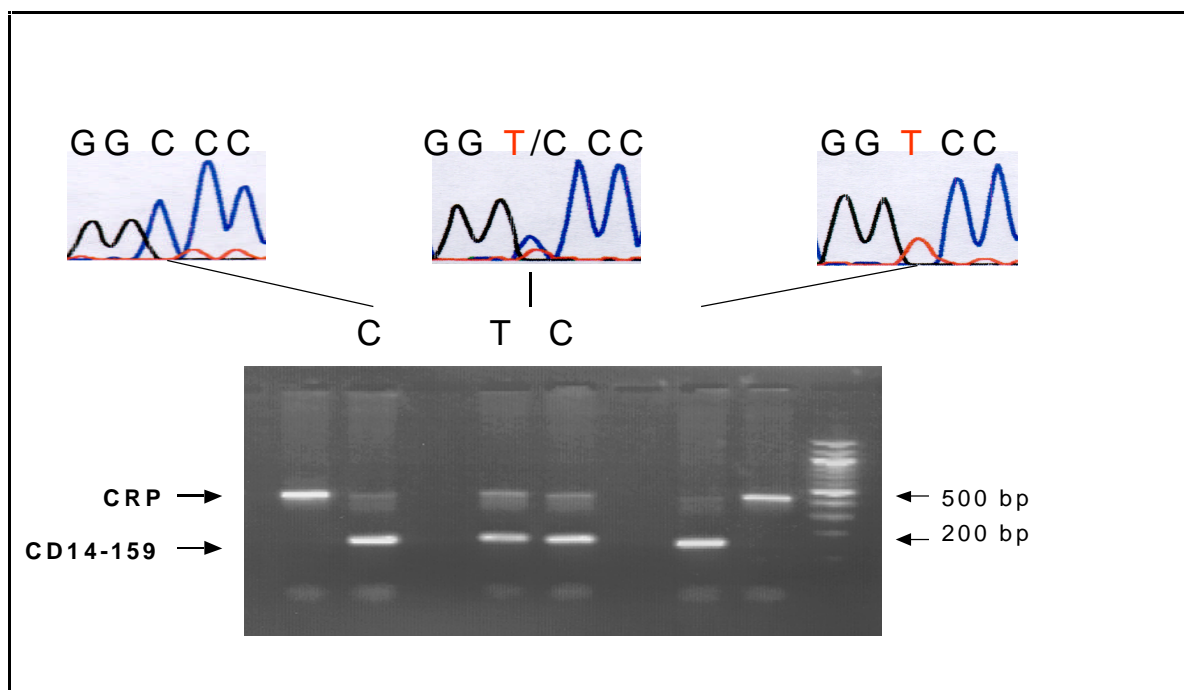
### 2.3.5. DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Produkte der SSP-PCR wurden durch Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Hierzu wurden zweiprozentige Agarosegele hergestellt. Auf einem Heizrührer wurden 100 ml Pufferlösung (1x TAE-Puffer), 2 g Agarose und 10 µl Ethidiumbromid erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch zum Erkalten in eine Form gegossen. Zusätzlich eingesteckte Kämme erzeugten Vertiefungen im Gel.

Zu 10 µl PCR-Produkt wurden 2 µl Ladepuffer hinzugegeben. Weiter wurde ein Molekulargewichtsstandard (100 bp DNA *ladder*) vorbereitet, der im Verhältnis 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt wurde. 8 µl des Molekulargewichtsstandards wurden ebenfalls mit 2 µl Ladepuffer versetzt. Die Gemische wurden in die Vertiefungen im Agarosegel pipettiert.

Die Gelelektrophorese lief bei 120 V etwa 30 Minuten. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkalierte in die negativ geladene DNA und ermöglichte somit ein Sichtbarmachen derselben. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Schirm (322 nm) sichtbar gemacht und mit einer angeschlossenen Fotoeinheit dokumentiert.

Abbildung 6: SSP-PCR und Gelelektrophorese



### 2.3.6. DNA-Sequenzierung

Die direkte Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte mittels *ABI Prism Big Dye Terminator* DNA-Sequenzierungskit nach Herstellerangaben. Ein Reaktionsansatz enthielt 5 µl (10 - 15 ng/µl) genomische DNA, 1,66 µl Mastermix, 4,9 µl 1xTaq-Puffer, 0,16 µl *AmpliTaq<sup>®</sup> Gold*-Polymerase (5 U/µl) und je 1 µl *upstream*- und *downstream*-Primer (10 pmol/µl). Das Volumen wurde mit *Aqua ad iniectabilia* auf 20 µl eingestellt. Das Programm für die erste PCR erfolgte wie in Tabelle 2 beschrieben. Die Sequenzierprimer sind in Tabelle 4 beschrieben. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Kontrolle lief ein 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard in der Gelelektrophorese mit. Durch optischen Vergleich der Bandenintensitäten des Molekulargewichtsstandards und der DNA wurde die DNA-Konzentration abgeschätzt. Der Reaktionsansatz für die Sequenzierungsreaktion enthielt 4 µl *Terminator Ready Reaction Mix*, 0,8 µl bis 4 µl des ersten PCR-Produktes und 1 µl des *upstream* bzw. *downstream* Sequenzierprimers. Das Volumen wurde mit einer entsprechenden Menge *Aqua ad iniectabilia* auf 20 µl gebracht.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde folgendes Programm verwendet:

*Tabelle 5: Programm der Sequenzierungsreaktion*

25 Zyklen:	
95 °C	10 sec
50 °C	5 sec
60 °C	4 sec

Anschließend wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Zu den 20 µl des zweiten PCR-Produktes wurden 10 µl Natrium-Acetat (pH 4,6), 250 µl 100% Ethanol und 80 µl Wasser pipettiert. Der Ansatz wurde für 15 min bei 15.000 *rpm* zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol abpipettiert und mit 250 µl 70% Ethanol für 5 bis 10 min bei 15.000 *rpm* erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanol wurde das Pellet 5 min in der Vakuumzentrifuge im Dunkeln getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 25 µl TSR (*Template Suppression Reagent*) gelöst und in *Genetic Analyzer Sample*-Röhrchen überführt.

Nach Denaturierung im Thermoblock bei 90 °C für 2 min und anschließender Abkühlung der Proben auf 0 °C, wurden diese in das Sequenziergerät eingesetzt und analysiert.

### 2.3.7. Nephelometrie

Die IgE-Spiegel der Blutspenderseren wurden im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen gemessen. Die IgE-Spiegel wurden mit einem Behring *Nephelometer Analyzer II* bestimmt. Folgende Reagenzien wurden eingesetzt:

N Latex IgE mono, Dade Behring, Dade Behring, Marburg, Deutschland

N *Supplementary Reagent L*, Dade Behring, Marburg, Deutschland

Das Prinzip der Methode basiert auf der Messung der Intensität von Streulicht. Das Streulicht entsteht dadurch, dass ein Primärstrahl auf ein Agglutinat trifft und abgelenkt wird. Das Agglutinat besteht aus mit spezifischen Antikörpern gegen Human-IgE beladenen Polystyrol-Partikeln und den in der zu messenden Serumprobe befindlichen IgE-Antikörpern. Die Intensität ist dabei innerhalb eines Konzentrationsbereiches proportional zu der Zahl der Teilchen. Die Immunnephelometrie nutzt die Tatsache, dass in Lösung befindliche Antigen-Antikörper-Komplexe Licht absorbieren und streuen. Bei Antikörper- bzw. Antigenüberschuss bilden sich lösliche Immunkomplexe. Gleichzeitig entstehen im Äquivalenzbereich unlösliche Immunkomplexe, die präzipitieren. Die Kurve von Heidelberger und Kendall beschreibt die Abhängigkeit der Präzipitatsmenge von der Antigenkonzentration bei konstanter Antikörperkonzentration. Im Testansatz ist eine definierte Menge spezifischer Antikörper gegen IgE-Moleküle enthalten. Unter der Voraussetzung des Antikörperüberschusses wird die Konzentration des Antigens bestimmt. Das IgE-Molekül stellt in diesem Fall das Antigen dar. Die Probe mit der fraglichen Menge an Immunkomplexen wird in eine Messküvette gegeben, durch die Strahlen, z.B. eines Helium-Neon-Lasers, geschickt werden. Das Streulicht wird an den Immunkomplexen abgelenkt und über ein Linsensystem auf einen Photodetektor fokussiert. Die Konzentration von Immunkomplexen und analog von Antigenen, in diesem Fall IgE, wird durch die Intensität des Streulichtes anhand einer Kalibrationskurve bestimmt. Die IgE-Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe von Verdünnungen eines Standards mit bekannter IgE-Konzentration ermittelt. Die Referenzwerte dieser Methode liegen für Erwachsene bei < 100 IU/ml. Ab 100 IU/ml dürfen die Werte als erhöht betrachtet werden. Um Messfehler ausschließen zu können, wurde aus dem Kollektiv der Blutspender eine Anzahl von Stichproben entnommen. Für die Stichproben wurde der IgE-Spiegel erneut bestimmt. Die zweite Messung ergab keine signifikante Abweichung von der ersten Messung.

### 2.3.8. ELISA

Um das lösliche CD14 (sCD14) im Serum zu messen, wurde der sCD14 *Immunoassay* der Firma Quantikine®, ein Festphasen-ELISA, verwendet. Ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für sCD14 ist, befindet sich auf einer Mikroplatte. Die Standardproben und die sCD14-Proben werden in die Vertiefungen der Mikroplatte pipettiert. Das vorhandene lösliche CD14 bindet an die immobilisierten Antikörper. Anschließend werden alle ungebundenen Substanzen aus dem Reagenz herausgewaschen und ein Enzym-gebundener polyklonaler Antikörper, der für sCD14 spezifisch ist, wird in die Vertiefungen gegeben. Es erfolgt ein erneuter Waschvorgang, um alle ungebundenen Substanzen herauszuwaschen. Eine Substratlösung wird in die Vertiefungen gegeben und die Farbe des Produktes ändert sich proportional zu der Menge an löslichem CD14, das im ersten Schritt an die Antikörper gebunden hat. Die Substratlösung ist eine Mischung aus Wasserstoffperoxid und stabilisiertem Tetramethylbenzidin. Die Farbumwandlung wird nach 30 Minuten Inkubationszeit durch 2 N Schwefelsäure gestoppt. Die Farbintensität wird im Spektralphotometer bestimmt. Der *Immunoassay* enthält acht Standardlösungen (Nullstandard = 0 pg/ml bis zur höchsten Standardlösung = 16,000 pg/ml). Bei jeder durchgeführten Messung werden die Standardproben doppelt mitgeführt. Es wird der Durchschnittswert der doppelten Messung ermittelt. Hiervon wird der Durchschnittswert des Nullstandards abgezogen und eine Standardkurve errechnet. Die sCD14-Serumproben wurden nur einfach gemessen.

### 2.3.9. Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der SPSS® Software, Version 9.0. Ein Signifikanzlevel ( $\alpha = 0,05$ ) war bindend für alle statistischen Analysen.

Um qualitative Eigenschaften von Gruppen zu beurteilen, wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewandt.

Voneinander unabhängige Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wird überprüft, ob zwei beprobte Grundgesamtheiten die gleiche Lage besitzen.

Die Beobachtungen aus beiden Gruppen werden kombiniert und in eine gemeinsame Reihenfolge gebracht, wobei im Falle von Rangbindungen der durchschnittliche Rang vergeben wird.

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wird überprüft, ob mehrere unabhängige Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Der Kruskal-Wallis-Test, eine Erweiterung des Mann-Whitney-U-Tests, ist die nichtparametrische Entsprechung der einfaktoriellen Varianzanalyse und erkennt Unterschiede in der Lage der Verteilung.

Mit Hilfe der Software Arlequin 2.000 (<http://lgb.unige.ch/arlequin>) wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Allele an einem polymorphen Genort (SNP) sowie das Kopplungsungleichgewicht (*Linkage disequilibrium*) zwischen benachbarten polymorphen Genorten (SNPs) berechnet. Die putativen Haplotypen wurden auf Basis eines *Expectation-Maximization-Algorithmus* geschätzt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. 1. Explorative Untersuchung

In der ersten explorativen Untersuchung wurde das periphere Blut von 200 Blutspendern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Giessen untersucht.

##### 3.1.1. Grund- und Anamnesedaten der Probanden

Das Kollektiv bestand aus 97 Frauen (48,5 %) und 103 Männern (51,5%). Zum Entnahmezeitpunkt lag der Median bei 27,11 Jahren. Der jüngste Proband war 18 Jahre alt, der älteste 67 Jahre.

Für jeden der Probanden wurde der IgE-Spiegel im Serum bestimmt. Definitionsgemäß wurde festgelegt, dass IgE-Werte  $\geq 100$  IU/ml als erhöht betrachtet werden. Ein erhöhter IgE-Spiegel wird als Phänotyp für eine allergische Disposition betrachtet.

*Tabelle 6: Grunddaten zu den Probanden*

Variable	IgE-Spiegel < 100 IU/ml	IgE-Spiegel $\geq 100$ IU/ml
Frauen (%)	74 (51,0)	22 (41,5)
Männer (%)	71 (49,0)	31 (58,5)
Alter in Jahren	$30,5 \pm 10,2$	$28,6 \pm 8,5$
Altersklasse bis 20 Jahre (%)	8 (5,5)	7 (13,2)
Altersklasse 20 Jahre bis 29 Jahre (%)	80 (55,2)	29 (54,7)
Altersklasse 30 Jahre bis 39 Jahre (%)	35 (24,1)	10 (18,9)
Altersklasse 40 Jahre bis 49 Jahre (%)	11 (7,6)	6 (11,3)
Altersklasse 50 Jahre bis 59 Jahre (%)	10 (6,9)	1 (1,9)
Altersklasse über 60 Jahre (%)	1 (0,7)	0 (0,0)

Der IgE-Spiegel im Serum wurde mit dem Geschlecht und dem Alter der Probanden assoziiert. Es zeigten sich keine geschlechts- bzw. altersspezifischen Unterschiede zwischen Männern und Frauen.

### 3.1.2. Assoziation der Anamnesedaten mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum

Die Probanden wurden in einem Fragebogen zu folgenden Kriterien befragt:

Atopie bei einem Verwandten 1. Grades, Atopie, Heuschnupfen, Hausstauballergie, Asthma, atopisches Ekzem, Allergietest, Raucher/Nichtraucher. Zusätzlich wurde ein spezifischer IgE-Test (Phadiatop SX1-Test) auf allergenspezifische Antikörper bei den Probanden durchgeführt. Die Allergene dieses Tests umfassen Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Hausstaub, Katzen- und Hundeschuppen und Cladosporium herbarum.

*Tabelle 7: Assoziation der Anamnesedaten mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum*

Variable	Gesamt IgE-Spiegel		
	N	Mittlerer Rang	p-Wert*
Spezifischer IgE-Test			
Positiv (%)	61	113,48	<0,0001
Negativ (%)	97	58,13	
Atopie bei einem Verwandten 1. Grades			
Ja (%)	54	78,67	n.s.
Nein (%)	89	67,96	
Klinisch diagnostizierte Atopie			
Ja (%)	43	99,60	0,001
Nein (%)	115	71,98	
Probanden mit Heuschnupfen			
Ja (%)	42	134,51	<0,0001
Nein (%)	151	86,57	
Probanden mit Hausstauballergie			
Ja (%)	25	127,20	0,002
Nein (%)	166	91,30	
Probanden mit Asthma			
Ja (%)	12	130,25	0,037
Nein (%)	182	95,34	
Probanden mit atopischem Ekzem			
Ja (%)	14	134,86	0,006
Nein (%)	177	92,93	
Probanden mit Allergietest in der Anamnese			
Ja (%)	79	109,34	0,021
Nein (%)	116	90,28	
Raucher			
Ja (%)	67	80,27	n.s.,**
Nein (%)	72	78,35	
Ex-Raucher (%)	19	81,16	

\* Mann-Whitney-U-Test, \*\* Kruskal-Wallis-Test, n.s. = nicht signifikant

Die Höhe des Gesamt-IgE-Spiegels im Serum assoziierte signifikant mit den Parametern Spezifischer IgE-Test, klinisch diagnostizierte Atopie, Heuschnupfen, Hausstauballergie, Asthma, Ekzem und Allergietest beim Hausarzt. Probanden, die zu diesen Merkmalen eine positive Atopieanamnese aufwiesen, hatten signifikant erhöhte IgE-Spiegel im Serum. In diesem Kollektiv zeigten die Rauchgewohnheiten der Probanden keinen Einfluß auf die Höhe des IgE-Spiegels im Serum. Eine positive Familienanamnese hatte hier ebenfalls keinen Einfluss auf den IgE-Spiegel.

### 3.1.3. PCR-SSP Genotypisierung der Polymorphismen des CD14-Antigens

Die Probanden wurden durch Genotypisierung mittels SSP-PCR für folgende SNPs typisiert: CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191), CD14-1359G>T (rs3138078) und CD14+1443T>G (rs2563298). Mittels PCR-Analyse wurden die Genotyp- und Allelfrequenzen für die CD14-Polymorphismen der 200 gesunden Blutspender bestimmt.

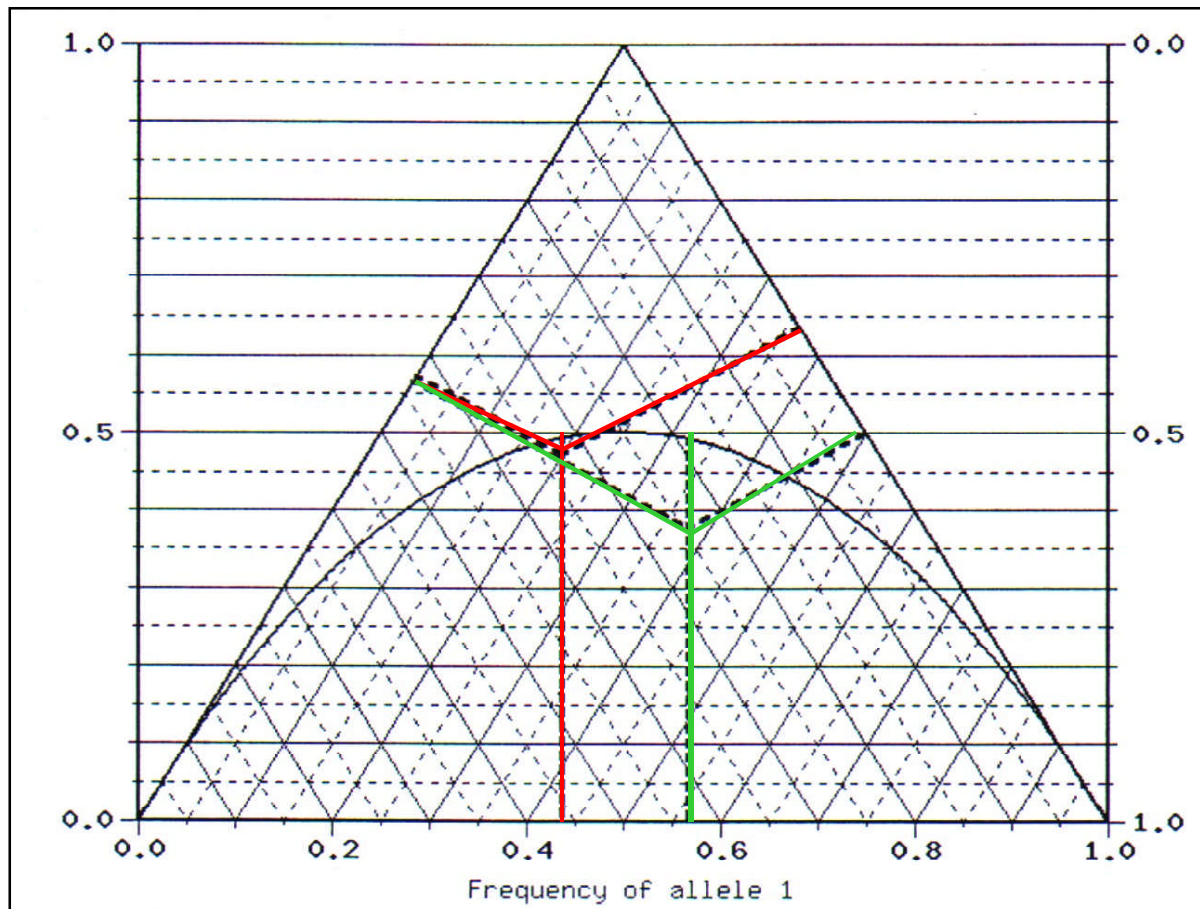
*Tabelle 8: Allelfrequenzen der CD14 SNPs*

SNP		Genotyp	Genotypfrequenz		Allel	Allelfrequenz	
			N	%		N	%
CD14-159C>T	rs2569190	CC	61	30,5	C	211	52,75
		CT	89	44,5			
		TT	50	25,0			
CD14-1145A>G	rs2569191	AA	61	30,5	A	210	52,5
		AG	88	44,0			
		GG	51	25,5			
CD14-1359G>T	rs3138078	GG	122	61,3	G	311	78,14
		GT	67	33,7			
		TT	10	5,0			
CD14+1443T>G	rs2563298	TT	20	10,2	T	116	29,59
		TG	76	38,8			
		GG	100	51,0			

Die Häufigkeiten für die homozygoten und heterozygoten Genotypen befanden sich im Einklang mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Dies zeigt eine Populationshomogenität des untersuchten Kollektivs an. Abbildung 7 zeigt das DeFinetti-Diagramm und das Hardy-Weinberg-Equilibrium für CD14-159C>T.



Abbildung 7: DeFinetti-Diagramm und Hardy-Weinberg-Equilibrium für CD14-159C>T



Legende:

Kontrollen (Linie in Rot), Fälle (Linie in Grün)

X-Achse: Frequenz Allel 1 (T)

Y-Achse: Frequenz Genotyp 12 (TC)

Länge der linken schrägen Linien: Frequenz des Genotyps 11 (TT)

Länge der rechten schrägen Linien: Frequenz des Genotyps 22 (CC)

$N_b$ : beobachtete Anzahl

$N_e$ : erwartete Anzahl

Berechnung der unterschiedlichen Allelfrequenzen in einer Kreuztabelle:

Chi-Quadrat-Analyse nach Pearson (df = 1):  $\chi^2 = 5,137$ , p-Wert = 0,02345

Kontrollen: Probanden mit IgE-Spiegel < 100 IU/l

Genotyp 11 (TT):  $N_b = 29$  (20,2%);  $N_e = 27,56$  (19,1%)

Genotyp 12 (TC):  $N_b = 68$  (47,2%);  $N_e = 70,88$  (49,2%)

Genotyp 22 (CC):  $N_b = 47$  (32,6%);  $N_e = 45,56$  (31,6%)

Allelfrequenzen (Standardabweichung):

Allel 1 (T):  $126/288 = 0,438 \pm 0,0298$

Allel 2 (C):  $162/288 = 0,562 \pm 0,0298$

Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium:

Chi-Quadrat-Analyse nach Pearson (df = 1):  $\chi^2 = 0,237$ , p-Wert = 0,62644

Fälle: Probanden mit IgE-Spiegel  $\geq 100$  IU/l

Genotyp 11 (TT):  $N_b = 20$  (37,7%);  $N_e = 16,98$  (32,0%)

Genotyp 12 (TC):  $N_b = 20$  (37,7%);  $N_e = 26,04$  (49,1%)

Genotyp 22 (CC):  $N_b = 13$  (24,5%);  $N_e = 9,98$  (18,8%)

Allelfrequenzen (Standardabweichung):

Allel 1 (T):  $60/106 = 0,566 \pm 0,0534$

Allel 2 (C):  $46/106 = 0,434 \pm 0,0534$

Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium:

Chi-Quadrat-Analyse nach Pearson (df = 1):  $\chi^2 = 2,850$ , p-Wert = 0,09139

CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191), CD14-1359G>T (rs3138078) und CD14+1443T>G (rs2563298) stehen miteinander hoch signifikant im Kopplungsungleichgewicht (Linkage disequilibrium), siehe Tabelle 9.

*Tabelle 9: Linkage Disequilibrium der CD14 SNPs*

SNP	CD14-1359G>T	CD14-1145A>G	CD14-159C>T	CD14+1443T>G
CD14-1359G>T	*	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
CD14-1145A>G	p < 0,01	*	p < 0,01	p < 0,01
CD14-159C>T	p < 0,01	p < 0,01	*	p < 0,01
CD14+1443T>G	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	*

Die untersuchten SNPs liegen in einem Haplotyp-Block. In der Regel findet innerhalb des CD14 Gens keine meiotische Rekombination statt. Der untersuchte Genabschnitt umfasste etwa 2000 Basenpaare.

*Abbildung 8: Schematische Darstellung der CD14-Genregion auf Chromosom 5*

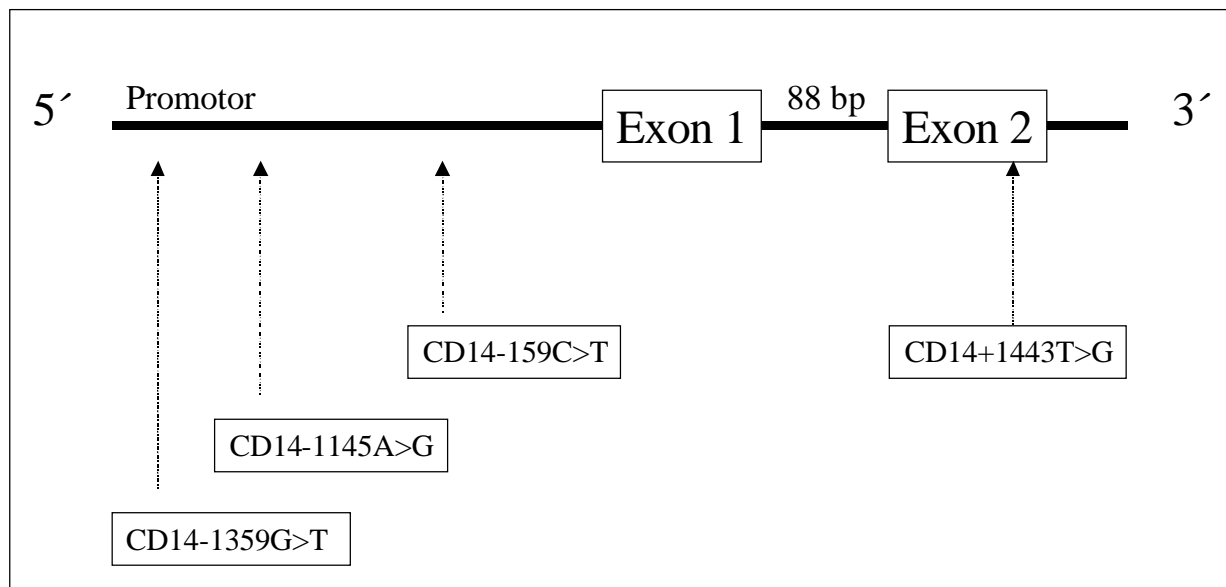


Abbildung 8 zeigt die schematische Struktur des CD14 Gens mit den untersuchten SNPs.

### 3.1.4. Der IgE-Spiegel im Serum ist mit den CD14-159C>T (rs2569190) und CD14-1145A>G (rs2569191) SNPs assoziiert

Die Genotypen der CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191), CD14-1359G>T (rs3138078) und CD14+1443T>G (rs2563298) SNPs wurden mit den im Serum der Probanden gemessenen IgE-Spiegeln assoziiert. Die Referenzwerte für den IgE-Spiegel liegen für Erwachsene bei < 100 IU/ml. Ab 100 IU/ml werden die Werte als erhöht betrachtet. In der statistischen Analyse des CD14-159C>T (rs2569190) SNP zeigten Probanden mit dem Genotyp TT signifikant höhere IgE-Spiegel als Träger der anderen Genotypen ( $p = 0,037$ ). Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen CC, CT und TT zeigte einen Gen-Dosis-Effekt. Probanden mit dem Genotyp GG zeigten beim CD14-1145A>G (rs2569191) SNP signifikant höhere IgE-Spiegel als Träger der Genotypen AA und AG ( $p = 0,049$ ). Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen zeigte ebenfalls einen Gen-Dosis-Effekt. Die Genotypen des CD14-1359G>T (rs3138078) SNP waren nicht signifikant mit den IgE-Spiegel im Serum assoziiert. Der CD14+1443T>G (rs2563298) SNP mit den Genotypen TT, TG und GG zeigte ebenfalls keine signifikante Assoziation mit den IgE-Spiegeln im Serum.

*Tabelle 10: Assoziation zwischen CD14 SNPs und IgE-Spiegeln im Serum*

SNP	Genotyp	IgE-Spiegel i.S.		IgE-Spiegel		Gesamt		p-Wert <sup>a</sup>
		< 100 IU/ml		≥ 100 IU/ml				
		N	%	N	%	N	%	
CD14-159C>T (rs2569190)	CC	48	33,1	13	24,5	61	30,8	0,037
	CT	68	46,9	20	37,7	88	44,4	
	TT	29	20,0	20	37,7	49	24,7	
	Fehlend: n = 2							
CD14-1145A>G (rs2569191)	AA	48	33,1	13	24,5	61	30,8	0,049
	AG	67	46,2	20	37,7	87	43,9	
	GG	30	20,7	20	37,7	50	25,3	
	Fehlend: n = 2							
CD14-1359G>T (rs3138078)	GG	84	58,3	36	67,9	120	60,9	0,394
	GT	53	36,8	14	26,4	67	34,0	
	TT	7	4,9	3	5,7	10	5,1	
	Fehlend: n = 3							
CD14+1443T>G (rs2563298)	TT	15	10,5	5	9,8	20	10,3	0,408
	TG	59	41,3	16	31,4	75	38,7	
	GG	69	48,3	30	58,8	99	51,0	
	Fehlend: n = 6							

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson, nicht korrigiert (Bonferroni)

Abbildung 9: Mediane der IgE-Spiegel und Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP

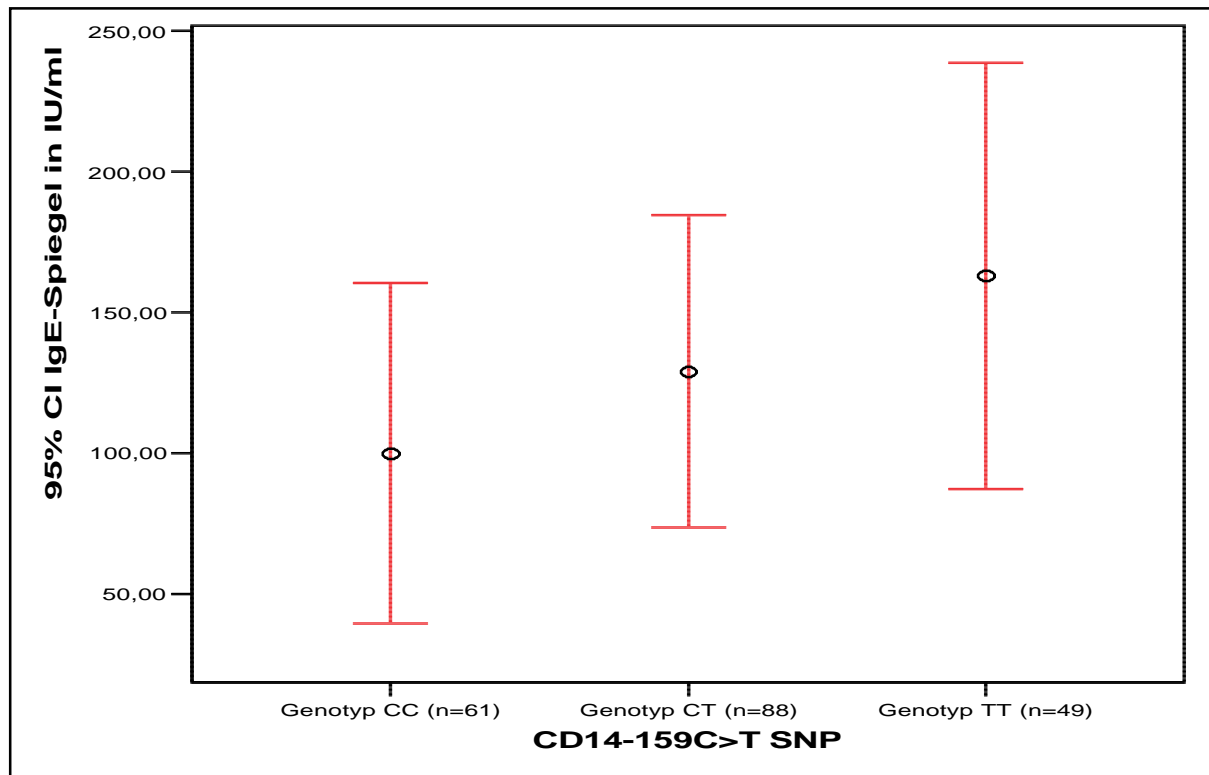
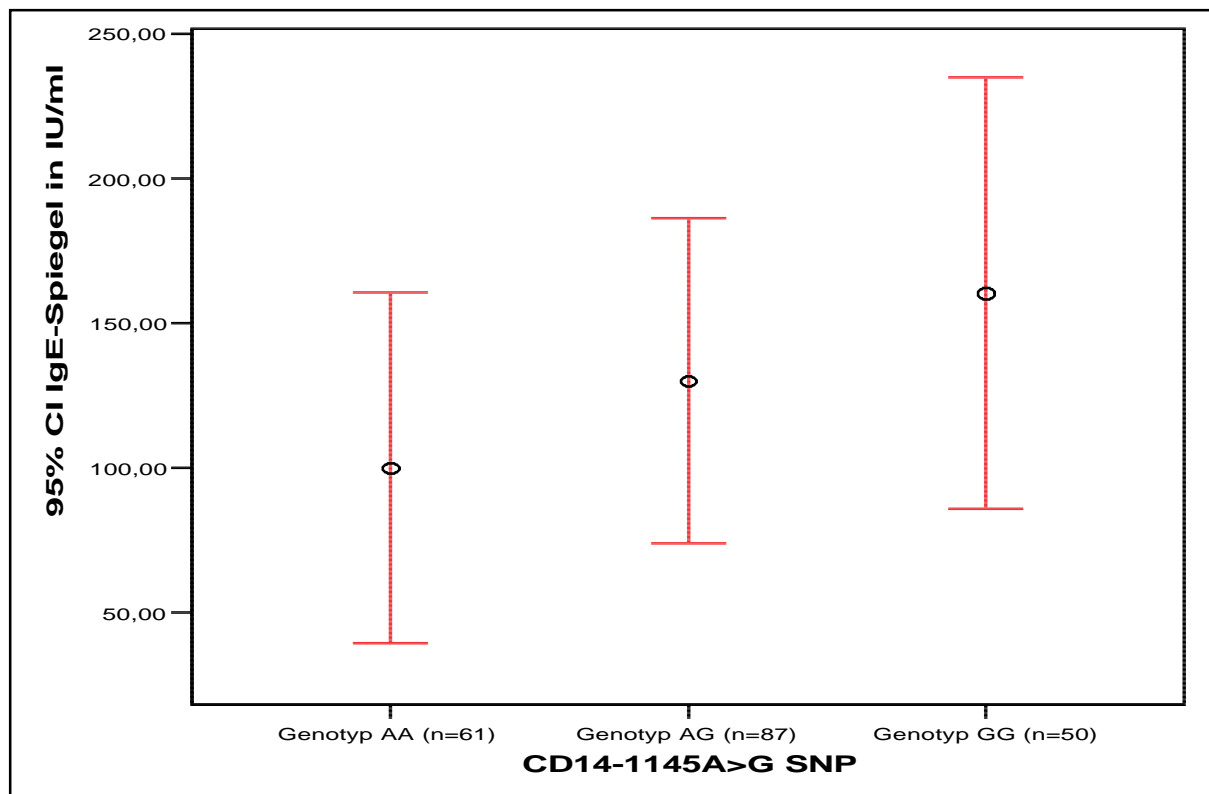


Abbildung 10: Mediane der IgE-Spiegel und Genotypen des CD14-1145A>G (rs2569191) SNP



### 3.1.5. Der sCD14-Spiegel im Serum ist mit den Genotypen CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191) und CD14-1359G>T (rs3138078) assoziiert

Für 189 Probanden wurde der sCD14-Spiegel im Serum bestimmt. Die homozygoten Genotypen der CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191), CD14-1359G>T (rs3138078) und CD14+1443T>G (rs2563298) SNPs wurden mit den im Serum der Probanden gemessenen sCD14-Spiegeln assoziiert. Die sCD14-Werte sind in  $\eta\text{g/ml}$  angegeben.

*Tabelle 11: Assoziation zwischen CD14 SNPs und sCD14-Spiegeln im Serum*

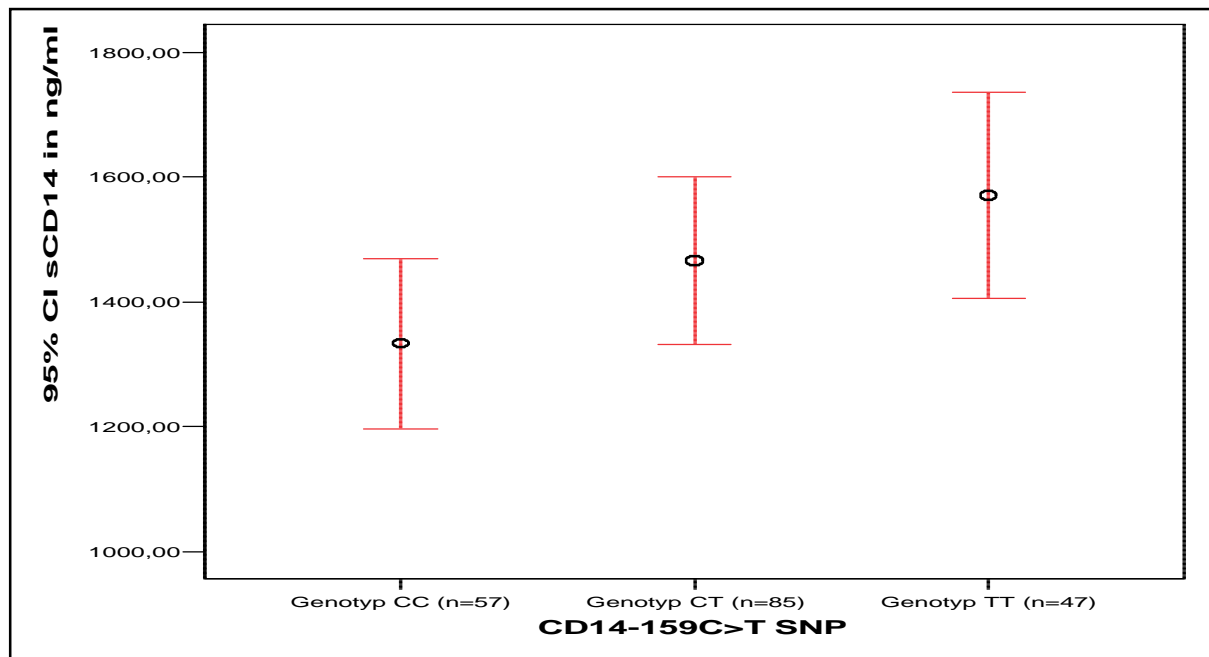
SNP	Genotyp	sCD14-Spiegel			
		N	Mittelwert in $\eta\text{g/ml}$	Mittlerer Rang	p-Wert*
CD14-159C>T (rs2569190)	CC	57	1333,68	513,66	0,037
	TT	47	1570,77	561,69	
CD14-1145A>G (rs2569191)	AA	57	1333,68	513,66	0,027
	GG	48	1583,88	563,05	
CD14-1359G>T (rs3138078)	GG	118	1500,32	586,89	0,039
	TT	10	1128,40	480,23	
CD14+1443T>G (rs2563298)	TT	20	1406,70	531,85	0,749
	GG	93	1477,91	588,40	

\* = Mann-Whitney-U-Test

Der CD14-159C>T (rs2569190) SNP wies signifikant höhere sCD14-Spiegel für Träger des Genotyps TT als für Träger des Genotyps CC auf (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,037$ ).

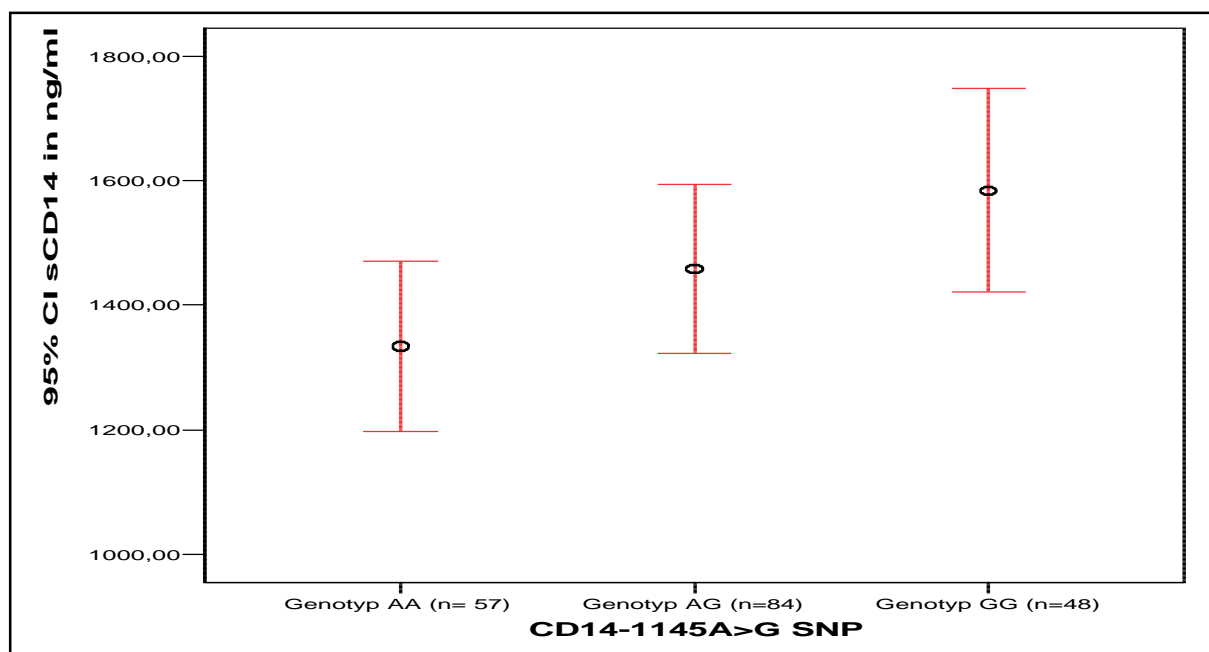
In der folgenden Grafik sind die Genotypen mit den entsprechenden sCD14-Spiegeln im Serum dargestellt. Es zeigte sich ein Gen-Dosis-Effekt.

Abbildung 11: Mediane der sCD14-Spiegel und Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP



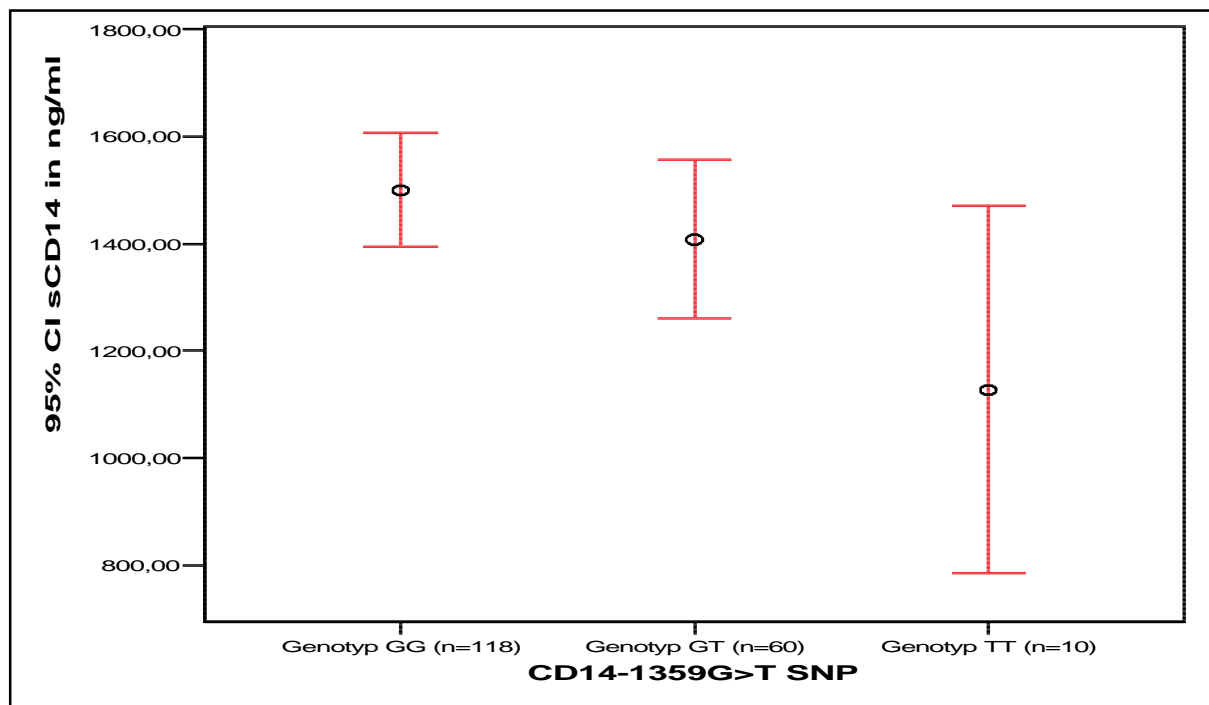
Für den CD14-1145A>G (rs2569191) SNP ergaben sich in der statistischen Analyse signifikant höhere sCD14-Spiegel für Träger der Genotypen GG als für Träger der Genotypen AA (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,027$ ). Die grafische Darstellung zeigt ebenfalls einen Gen-Dosis-Effekt.

Abbildung 12: Mediane der sCD14-Spiegel und Genotypen des CD14-1145A>G (rs2569191) SNP



Für den CD14-1359G>T (rs3138078) SNP wurden signifikant höhere sCD14-Werte für Träger der Genotypen GG als für Träger der Genotypen TT errechnet (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,039$ ). Die Grafik zeigt einen Gen-Dosis-Effekt.

Abbildung 13: Mediane der sCD14-Spiegel und Genotypen des CD14-1359G>T (rs3138078) SNP



Der CD14+1443T>G (rs2563298) SNP zeigte keine Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test:  $p > 0,05$ ) bezüglich der Assoziation der homozygoten Merkmalsträger mit der Höhe des sCD14-Spiegels im Serum.

## 3.2. Replikationsstudie

In der Replikationsstudie wurden 690 Probanden untersucht, um die in der 1. Explorativen Untersuchung ermittelten Ergebnisse zu überprüfen.

### 3.2.1. Grunddaten der Probanden

Das Kollektiv der Replikationsstudie bestand aus 245 Frauen (35,5 %) und 445 Männern (64,5%). Der Median lag bei 32,80 Jahren. Der jüngste Proband war 18 Jahre alt, der älteste 67 Jahre. Für die Probanden wurde ebenfalls der IgE-Spiegel im Serum als intermediärer Atopiephänotyp bestimmt.

*Tabelle 12: Grunddaten zu den Probanden der Replikationsstudie*

Variable	IgE-Spiegel < 100 IU/ml	IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml
Frauen (%)	185 (38,5)	60 (28,6)
Männer (%)	295 (61,5)	150 (71,4)
Alter in Jahren	36,0 ± 11,7	32,6 ± 10,1
Altersklasse bis 20 Jahre (%)	13 (2,7)	5 (2,4)
Altersklasse 20 Jahre bis 29 Jahre (%)	175 (36,5)	101 (48,1)
Altersklasse 30 Jahre bis 39 Jahre (%)	131 (27,3)	55 (26,2)
Altersklasse 40 Jahre bis 49 Jahre (%)	96 (20,0)	34 (16,2)
Altersklasse 50 Jahre bis 59 Jahre (%)	43 (9,0)	13 (6,2)
Altersklasse über 60 Jahre (%)	22 (4,6)	2 (1,0)



### 3.2.2. Der IgE-Spiegel im Serum ist mit Alter und Geschlecht der Probanden assoziiert

In der nachfolgenden Tabelle sind die geschlechtsspezifischen Daten zu Alter und Höhe des IgE-Spiegels im Serum der Probanden aufgeführt.

*Tabelle 13: Geschlechtsspezifische Stratifizierung von Alter und IgE-Spiegel im Serum*

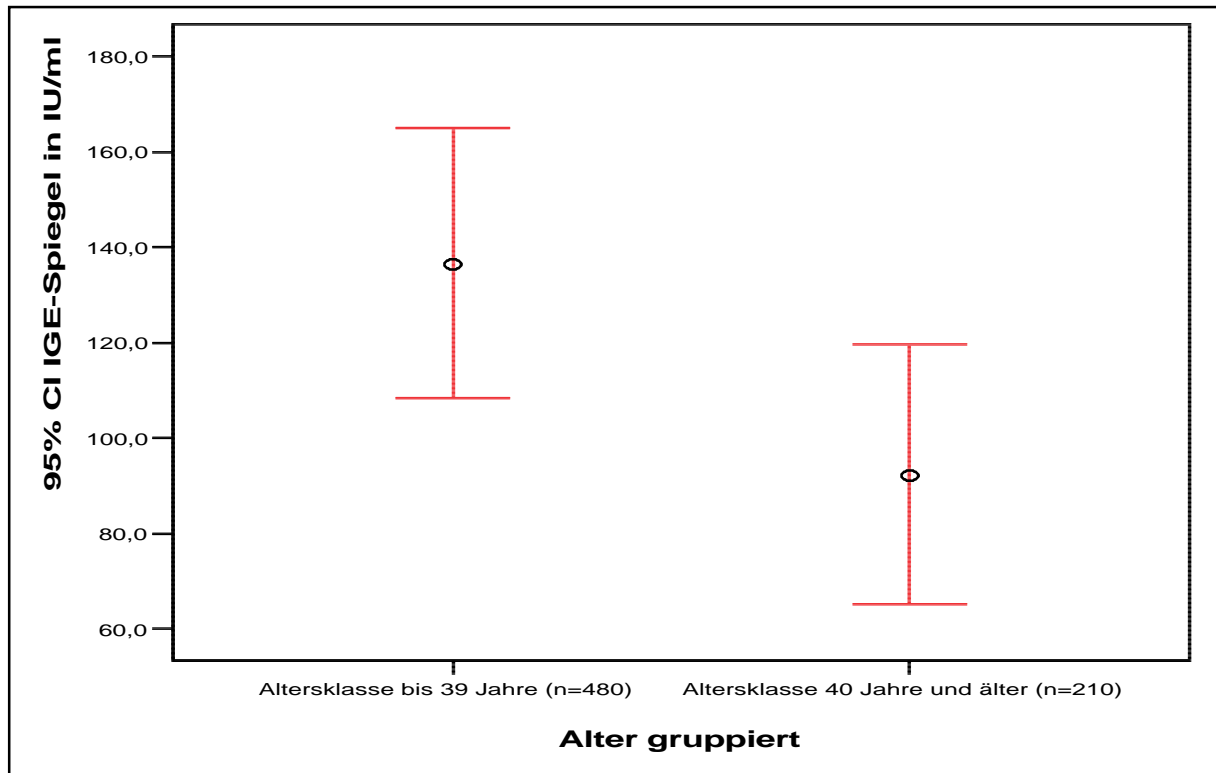
Variable		IgE-Spiegel < 100 IU/ml	IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml	Gesamt
Alter unter 20 Jahre	Männer (%)	6 (2,0)	3 (2,0)	9 (2,0)
	Frauen (%)	7 (3,8)	2 (3,3)	9 (3,7)
	Gesamt (%)	13 (2,7)	5 (2,4)	18 (2,6)
20 Jahre bis 29 Jahre	Männer (%)	96 (32,5)	73 (48,7)	169 (38,0)
	Frauen (%)	79 (42,7)	28 (46,7)	107 (43,7)
	Gesamt (%)	175 (36,5)	101 (48,1)	276 (40,0)
30 Jahre bis 39 Jahre	Männer (%)	89 (30,2)	34 (22,7)	123 (27,6)
	Frauen (%)	42 (22,7)	21 (35,0)	63 (25,7)
	Gesamt (%)	131 (27,3)	55 (26,2)	186 (27,0)
40 Jahre bis 49 Jahre	Männer (%)	69 (23,4)	27 (18,0)	96 (21,6)
	Frauen (%)	27 (14,6)	7 (11,7)	34 (13,9)
	Gesamt (%)	96 (20,0)	34 (16,2)	130 (18,8)
50 Jahre bis 59 Jahre	Männer	24 (8,1)	11 (7,3)	35 (7,9)
	Frauen	19 (10,3)	2 (3,3)	21 (8,6)
	Gesamt	43 (9,0)	13 (6,2)	56 (8,1)
60 Jahre und älter	Männer	11 (3,7)	2 (1,3)	13 (2,9)
	Frauen	11 (5,9)	0 (0,0)	11 (4,5)
	Gesamt	22 (4,6)	2 (1,0)	24 (3,5)

Der IgE-Spiegel im Serum wurde mit den Altersklassen der Probanden assoziiert. Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen den sechs Altersgruppen und dem IgE-Spiegel im Serum. Die geschlechtsspezifische Auswertung der Altersgruppen ergab ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang. Tendentiell zeigte sich bei den 690 Probanden mit steigendem Alter ein Abfall des IgE-Spiegels im Serum.

Das Kollektiv wurde daraufhin in zwei Altersklassen aufgeteilt. Die erste Gruppe beinhaltet alle Probanden bis einschließlich 39 Jahre ( $n = 480$ ), die zweite Gruppe alle Probanden ab 40 Jahre und älter ( $n = 210$ ). Die jüngere Altersgruppe wies im Gesamtkollektiv signifikant höhere IgE-Spiegel als die ältere Probandengruppe auf (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,012$ ).

Dieser Zusammenhang war auch nach geschlechtsspezifischer Dichotomisierung signifikant: Die Männergruppe bis 39 Jahre zeigte ebenfalls wie die Frauengruppe bis 39 Jahre signifikant höhere IgE-Spiegel im Serum als die entsprechenden älteren Gruppen (Männer: Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,048$ ; Frauen: Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,049$ ).

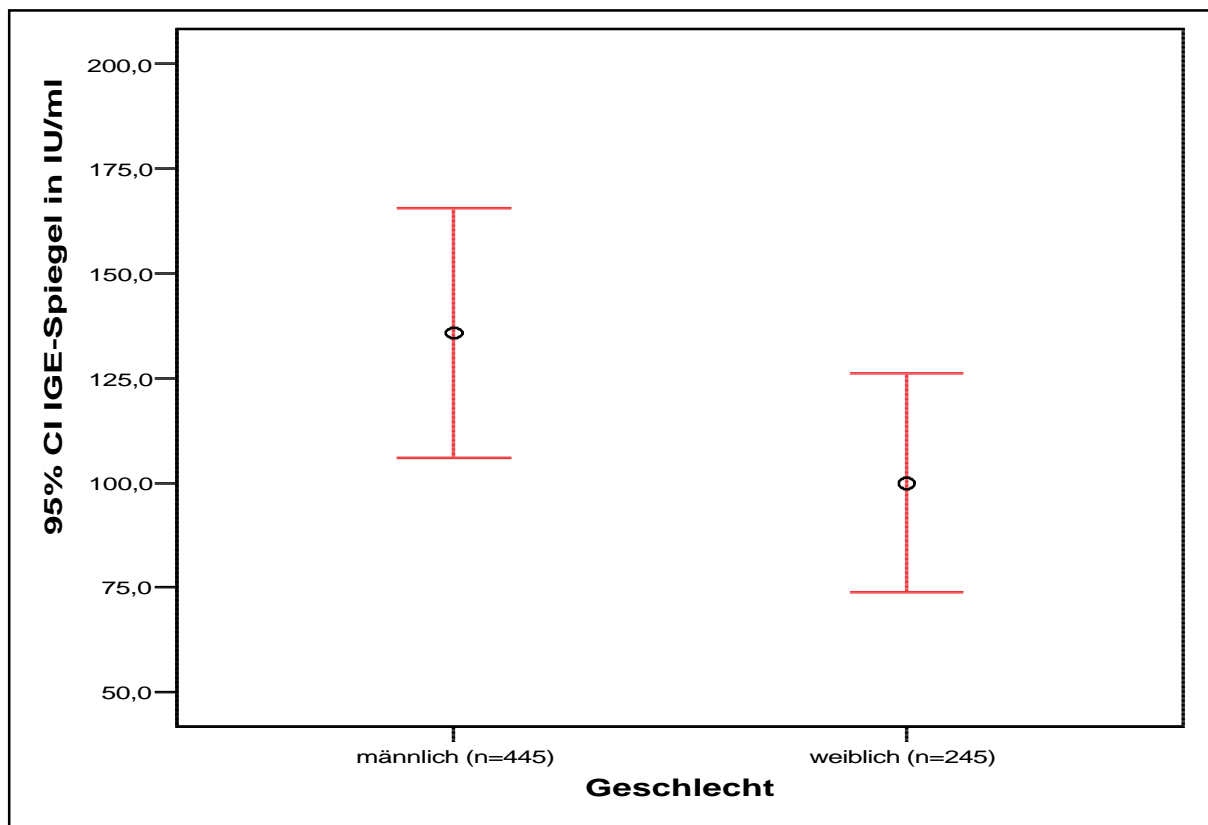
Abbildung 14: Assoziation der Höhe des IgE-Spiegels mit dem Alter der Probanden



$p = 0,012$  (Mann-Whitney-U-Test)

Der IgE-Spiegel im Serum wurde mit dem Geschlecht der Probanden assoziiert. In Abbildung 15 ist ersichtlich, dass Männer signifikant höhere IgE-Spiegel im Serum aufweisen als Frauen (Mann-Whitney-U-Test:  $p < 0,001$ ).

Abbildung 15: Mediane IgE-Spiegel (95%CI) bei Männern und Frauen



$p < 0,001$  (Mann-Whitney-U-Test)

### 3.2.3. PCR-SSP Genotypisierung des CD14-159C>T (rs2569190) SNP in der Replikationsstudie

Die Probanden wurden durch Genotypisierung mittels SSP-PCR für den CD14-159C>T (rs2569190) SNP typisiert.

*Tabelle 14: Allelfrequenzen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP in der Replikationsstudie*

SNP		Genotyp	Genotypfrequenz		Allel	Allelfrequenz	
			N	%		N	%
CD14-159C>T	rs2569190	CC	175	25,4	C	729	52,8
		CT	379	54,9			
		TT	136	19,7	T	651	47,2

### 3.2.4. Der IgE-Spiegel im Serum ist nicht mit dem CD14-159C>T (rs2569190) SNP assoziiert

Der CD14-159C>T (rs2569190) SNP wurde mit den im Serum der Probanden gemessenen IgE-Spiegeln assoziiert. Die Referenzwerte für IgE-Spiegel liegen für Erwachsene bei < 100 IU/ml. Ab 100 IU/ml werden die Werte als erhöht betrachtet. In der Analyse der dichotomisierten Variable Serum-IgE-Spiegel zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen den CD14-159C>T Genotypen und den IgE-Spiegeln im Serum.

*Tabelle 15: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum*

SNP	Genotyp	IgE-Spiegel i.S.		IgE-Spiegel		Gesamt		p-Wert
		< 100 IU/ml		≥ 100 IU/ml				
		N	%	N	%	N	%	
CD14-159C>T (rs2569190)	CC	119	24,8	56	26,7	175	25,4	0,837 <sup>a</sup>
	CT	267	55,6	112	53,3	379	54,9	
	TT	94	19,6	42	20,0	136	19,7	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson (zweiseitig)

Eine Analyse der quantitativen Ausprägung des IgE-Spiegels mit nichtparametrischen Testverfahren zeigte ebenfalls keine Assoziation zwischen den Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP und den IgE-Spiegeln im Serum.

*Tabelle 16: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum, stratifiziert nach dem Geschlecht*

SNP	Genotyp	Männer					Frauen				
		IgE-Spiegel		IgE-Spiegel		p-Wert	IgE-Spiegel		IgE-Spiegel		p-Wert
		< 100 IU/ml		≥ 100 IU/ml			< 100 IU/ml		≥ 100 IU/ml		
		N	%	N	%		N	%	N	%	
CD14-159C>T (rs2569091)	CC	79	26,8	39	26,0	0,958 <sup>a</sup>	40	21,6	17	28,3	0,448 <sup>a</sup>
	CT	155	52,5	81	54,0		112	60,5	31	51,7	
	TT	61	20,7	30	20,0		33	17,8	12	20,0	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson (zweiseitig)

### 3.3. Stratifizierung nach der Jahreszeit der Blutentnahme

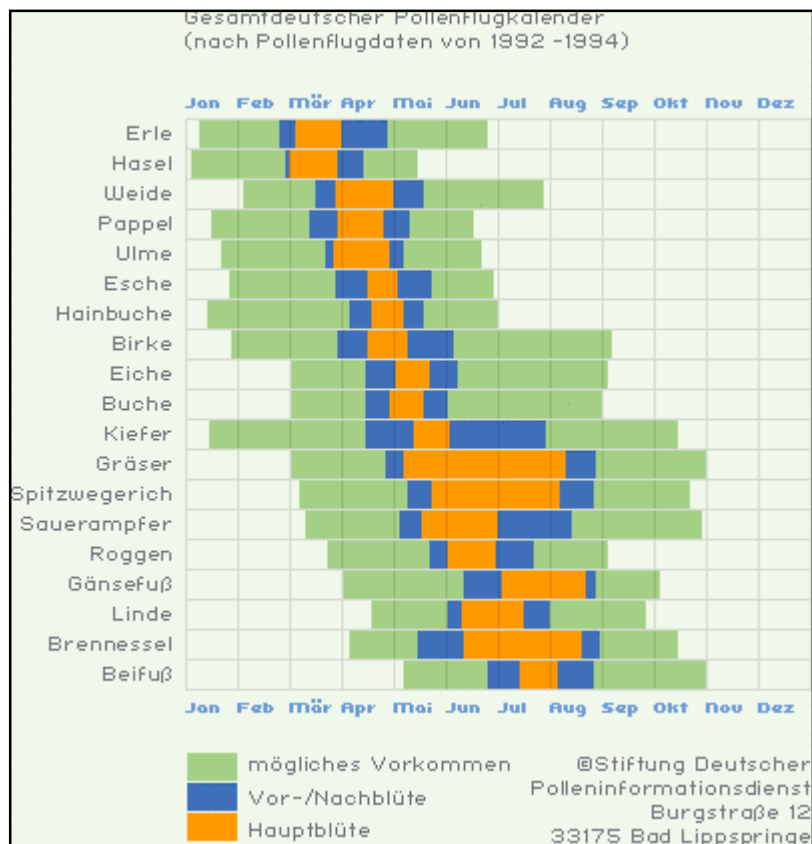
Für diese Fragestellung wurden alle Probanden ( $n = 890$ ) aus der 1. explorativen Untersuchung und der Replikationsstudie rekrutiert, um ausreichend hohe Fallzahlen in den Subgruppen zu erhalten.

Die Spenderblutproben aller Probanden wurden dem Zeitpunkt ihrer Entnahme entsprechend in zwei Kategorien eingeteilt:

1. Blutentnahme zur Pollenflugsaison
2. Blutentnahme außerhalb der Pollenflugsaison

Der Zeitraum der Pollenflugsaison wurde auf die Monate März bis Juli festgelegt. Die Entnahme außerhalb der Pollenflugsaison beinhaltete die Monate August bis Februar.

Abbildung 16: Pollenflugkalender<sup>47</sup>



## 1. Blutentnahme zur Zeit der Pollenflugsaison

Diese Gruppe beinhaltete alle Probanden, deren Blutproben in der Pollenflugzeit von März bis Juli entnommen wurden. Das Kollektiv bestand aus 196 Frauen und 275 Männern im Alter von 18 bis 67 Jahren.

*Tabelle 17: Grunddaten zu den Probanden mit Sammelzeitpunkt in der Pollenflugzeit*

Variable	IgE-Spiegel < 100 IU/ml	IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml
Frauen (%)	148 (45,1)	48 (33,6)
Männer (%)	180 (54,9)	95 (66,4)
Alter in Jahren	34,6 ± 11,4	32,6 ± 9,7
Altersklasse bis 20 Jahre (%)	12 (3,7)	3 (2,1)
Altersklasse 20 Jahre bis 29 Jahre (%)	133 (40,7)	66 (46,2)
Altersklasse 30 Jahre bis 39 Jahre (%)	83 (25,4)	44 (30,8)
Altersklasse 40 Jahre bis 49 Jahre (%)	63 (19,3)	20 (14,0)
Altersklasse 50 Jahre bis 59 Jahre (%)	26 (8,0)	9 (6,3)
Altersklasse über 60 Jahre (%)	10 (3,1)	1 (0,7)

## 2. Blutentnahme außerhalb der Pollenflugsaison

Diese Gruppe beinhaltete alle Probanden, deren Proben in der Pollenflugzeit von August bis Februar entnommen wurden. Das Kollektiv bestand aus 146 Frauen und 273 Männern im Alter von 18 bis 67 Jahren.

*Tabelle 18: Grunddaten zu den Probanden mit Sammelzeitpunkt in der Nicht-Pollenflugzeit*

Variable	IgE-Spiegel < 100 IU/ml	IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml
Frauen (%)	111 (37,4)	34 (28,3)
Männer (%)	186 (62,6)	86 (71,7)
Alter in Jahren	34,8 ± 11,8	30,9 ± 10,2
Altersklasse bis 20 Jahre (%)	9 (3,0)	9 (7,5)
Altersklasse 20 Jahre bis 29 Jahre (%)	121 (40,7)	64 (53,3)
Altersklasse 30 Jahre bis 39 Jahre (%)	83 (27,9)	21 (17,5)
Altersklasse 40 Jahre bis 49 Jahre (%)	44 (14,8)	20 (16,7)
Altersklasse 50 Jahre bis 59 Jahre (%)	27 (9,1)	5 (4,2)
Altersklasse über 60 Jahre (%)	13 (4,4)	1 (0,8)

### 3.3.1. Die nach der Jahreszeit stratifizierten Probandengruppen zeigen keine Assoziation zwischen SNP und IgE-Spiegel im Serum

#### 1. Blutentnahme zur Zeit der Pollenflugsaison

Die Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP der zur Pollenflugzeit entnommenen Blutproben wurden mit den IgE-Spiegeln im Serum assoziiert. Das Kollektiv wurde zusätzlich geschlechtsspezifisch untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen CD14-159C>T (rs2569190) und den IgE-Spiegeln im Serum.

*Tabelle 19: Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum*

SNP	Genotyp	IgE-Spiegel i.S. < 100 IU/ml		IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml		Gesamt		p-Wert
		N	%	N	%	N	%	
CD14-159C>T (rs2569190)	CC	76	23,2	40	28,0	116	24,6	0,468 <sup>a</sup>
	CT	188	57,3	74	51,7	262	55,6	
	TT	64	19,5	29	20,3	93	19,7	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson (zweiseitig)

*Tabelle 20: Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum, stratifiziert nach dem Geschlecht*

SNP	Genotyp	Männer					Frauen				
		IgE-Spiegel < 100 IU/ml		IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml		p-Wert	IgE-Spiegel < 100 IU/ml		IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml		p-Wert
		N	%	N	%		N	%	N	%	
CD14-159C>T (rs2569190)	CC	38	21,1	24	25,3	0,698 <sup>a</sup>	38	25,7	16	33,3	0,542 <sup>a</sup>
	CT	105	58,3	51	53,7		83	56,1	23	47,9	
	TT	37	20,6	20	21,1		27	18,2	9	18,8	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson (zweiseitig)



## 2. Blutentnahme außerhalb der Pollenflugsaison

Die Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP der außerhalb der Pollenflugsaison entnommenen Blutproben wurden ebenfalls mit den IgE-Spiegeln im Serum assoziiert. Das Kollektiv wurde zusätzlich geschlechtsspezifisch untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen CD14-159C>T (rs2569190) und den IgE-Spiegeln im Serum.

*Tabelle 21: Nicht-Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum*

SNP	Genotyp	IgE-Spiegel i.S. < 100 IU/ml		IgE-Spiegel ≥ 100 IU/ml		Gesamt		p-Wert
		N	%	N	%	N	%	
CD14-159C>T (rs2569190)	CC	91	30,6	29	24,2	120	28,8	0,172 <sup>a</sup>
	CT	147	49,5	58	48,3	205	49,2	
	TT	59	19,9	33	27,5	92	22,1	

*Fehlend: n = 2*

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson (zweiseitig)

*Tabelle 22: Nicht-Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum, stratifiziert nach dem Geschlecht*

SNP	Genotyp	Männer					Frauen				
		IgE-Spiegel		IgE-Spiegel		p-Wert	IgE-Spiegel		IgE-Spiegel		p-Wert
		< 100 IU/ml		≥ 100 IU/ml			< 100 IU/ml		≥ 100 IU/ml		
		N	%	N	%		N	%	N	%	
CD14-159C>T (rs2569190)	CC	65	34,9	22	25,6	0,292 <sup>a</sup>	26	23,4	7	20,6	0,201 <sup>a</sup>
	CT	82	44,1	42	48,8		65	58,6	16	47,1	
	TT	39	21,0	22	25,6		20	18,0	11	32,4	

*Fehlend: n = 2*

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson (zweiseitig)

### **3.4. Kinder aus der ISAAC-Studie**

In Kooperation mit einer Münchener Arbeitsgruppe um Dr. Michael Kabesch aus der Universitätskinderklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München wurde der sCD14-Spiegel im Serum für zwei Kinderkollektive bestimmt. Die Kollektive bestehen aus 170 Kindern im Alter von 10 Jahren aus Dresden sowie 186 Kindern im Alter von 10 Jahren aus dem Raum München. Die sCD14-Werte für beide Kollektive wurden im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Giessen ermittelt. Die statistische Analyse wurde durch Herrn Dr. Kabesch aus München durchgeführt.

#### **3.4.1. Kollektiv Dresden**

Die sCD14-Werte im Serum wurden für 170 Kinder aus Dresden bestimmt. Der kleinste Wert war 190 ng/ml. Der größte Wert war 2712 ng/ml. Der Median lag bei 833 ng/ml. Herr Dr. Kabesch assoziierte die sCD14-Werte mit den in München ermittelten Genotypen des CD14-Antigens. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen sCD14 und den Genotypen CC, CT und TT des CD14-159C>T (rs2569190) SNP. Tendenziell waren die sCD14-Werte im Serum bei Trägern des TT-Genotyps erhöht.

#### **3.4.2. Kollektiv München**

Die sCD14-Werte im Serum wurden zusätzlich für 186 Kinder aus München bestimmt. Der kleinste Wert war 272 ng/ml. Der größte Wert war 3200 ng/ml. Der Median lag bei 1394 ng/ml.

In diesem Kollektiv zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen den sCD14-Werten und den Genotypen des CD14-Antigens.

### **3.4.3. Ergebnisse der Kollektive München und Dresden im Vergleich mit dem Giessener Kollektiv**

In der ISAAC-Studie wurden Kinder aus München und Dresden untersucht, die alle eine Allergieanamnese aufwiesen. In diesen Kollektiven zeigten Träger des CD14-159TT-Genotyps tendentiell höhere sCD14-Werte im Serum als Träger der anderen Genotypen.

Das Giessener Kollektiv bestand aus gesunden und erwachsenen Probanden. Träger des CD14-159TT-Genotyps zeigen signifikant höhere sCD14-Werte als Träger der anderen Genotypen des CD14-Antigens (CC: 1404  $\eta$ g/ml vs TT: 1588  $\eta$ g/ml,  $P < 0,04$ , Mann-Whitney-U-Test).

Herr Dr. Kabesch hat alle drei Kollektive für die statistische Analyse zusammengefügt und festgestellt, dass das Gesamtkollektiv signifikant erhöhte sCD14-Werte für Träger der CD14-159-TT-Genotypen aufwies als für Träger des CD14-159CC-Genotyps (CC: 1017  $\eta$ g/ml vs TT: 1370  $\eta$ g/ml,  $P < 0,03$ , Mann-Whitney-U-Test).

Insgesamt wurden in München im Rahmen der ISAAC-Studie 2048 asthmatische Kinder und Kinder mit anderen atopischen Erkrankungen untersucht. Es handelte sich um 256 Kinder aus München im Alter von 6 Jahren, 1087 Kinder aus München im Alter von 10 Jahren und 705 Kinder aus Dresden im Alter von 10 Jahren. Alle Kinder wurden für den CD14-159C>T (rs2569190) SNP genotypisiert. Zudem wurden die IgE-Spiegel im Serum bestimmt. Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen den Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP und den IgE-Spiegeln im Serum ermittelt werden. Zudem konnte keine Assoziation zwischen dem CD14 SNP und der Anzahl positiver *Skin prick Tests* sowie atopischen Phänotypen aufgezeigt werden.

## 4. DISKUSSION

Bisher wurden zahlreiche Assoziationsstudien publiziert, die einen Zusammenhang zwischen dem CD14-159C>T (rs2569190) SNP und allergieassoziierten Phänotypen (allergische Erkrankungen, Atopie, IgE- und sCD14-Spiegel im Serum) untersucht haben. Die Ergebnisse dieser Studien stellen sich kontrovers dar. Vor dem Hintergrund der Untersuchungsergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden, sollen die verschiedenen Erkenntnisse der Assoziationsstudien diskutiert werden. Initial werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend dargestellt.

### 4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie über Promotorvarianten des CD14-Gens wurden in der 1. explorativen Untersuchung 200 Blutspender des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Giessen für die CD14-159C>T (rs2569190) Promotormutation genotypisiert. Für alle Probanden wurde der IgE-Spiegel im Serum bestimmt. Der sCD14-Spiegel im Serum wurde für 189 Probanden ermittelt. Die Probanden wurden in einem Fragebogen nach typischen allergischen Erkrankungen wie Heuschnupfen, Hausstauballergie, allergisches Asthma bronchiale und atopisches Ekzem bei den Probanden selbst sowie bei deren Verwandten ersten Grades (Eltern und Geschwister) befragt. Probanden mit positivem spezifischen IgE-Test, Atopie, Heuschnupfen, Hausstauballergie, Asthma, atopischem Ekzem sowie positiven Allergietests in der Anamnese wiesen signifikant erhöhte IgE-Spiegel im Serum auf. Die CD14-159C>T (rs2569190) Genotypen waren nicht signifikant mit den in der Anamnese ermittelten Phänotypen assoziiert. Zusätzlich zum CD14-159C>T (rs2569190) SNP wurden CD14-1145A>G (rs2569191), CD14-1359G>T (rs3138078) und CD14-1443T>G (rs2563298) typisiert. Die Genotypen wurden mit den IgE- und sCD14-Spiegeln im Serum assoziiert. Träger der Genotypen CD14-159TT und CD14-1145GG zeigten signifikant höhere IgE-Spiegel im Serum als Träger der anderen Genotypen. Die Genotypen CD14-159TT, CD14-1145GG und CD14-1359GG zeigten signifikant erhöhte sCD14-Spiegel im Serum.

In der Replikationsstudie wurden weitere 690 Probanden untersucht. Für die neuen Probanden wurde ebenfalls der IgE-Spiegel im Serum bestimmt. Die Probanden wurden für den CD14-159C>T (rs2569190) SNP genotypisiert.

Die Genotypen wurden mit den IgE-Spiegeln im Serum assoziiert. Im Kollektiv der Replikationsstudie war der IgE-Spiegel im Serum nicht mit den Genotypen der CD14-159C>T (rs2569190) Promotormutation assoziiert. Auch die geschlechtsspezifische Stratifizierung des Kollektivs zeigte keine signifikante Assoziation zwischen IgE-Spiegeln und Genotypen. Nebenfundlich zeigten Männer in der Replikationsstudie signifikant erhöhte IgE-Spiegel im Vergleich zu Frauen. Zudem findet sich nach altersspezifischer Dichotomisierung ein signifikanter Abfall der Höhe des IgE-Spiegels im Serum mit zunehmendem Alter.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Jahreszeit und Höhe des IgE-Spiegels im Serum zu ermitteln, wurden die Spenderblutproben des Gesamtkollektivs dem Zeitpunkt ihrer Entnahme entsprechend in zwei Kategorien eingeteilt: Entnahme zur Pollenflugzeit und Entnahme zur Nicht-Pollenflugzeit. Der Zeitraum der Pollenflugsaison wurde auf die Monate März bis Juli festgelegt. Die Entnahme außerhalb der Pollenflugsaison beinhaltete die Monate August bis Februar. Die Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP wurden mit den IgE-Spiegeln im Serum assoziiert. Sowohl in der Gruppe der Probanden, deren Blut in der Pollenflugsaison entnommen worden war, als auch in der Gruppe der Nicht-Pollenzeit-Probanden, war keine signifikante Assoziation zwischen IgE-Spiegeln im Serum und CD14-159 Genotypen nachzuweisen. Auch hier konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eindrücklich die Bedeutung der Replikation genetischer Assoziationsstudien an einem unabhängigen Kollektiv. Initial positive Befunde (ohne Bonferroni-Korrektur) wurden in einer zweiten Kohorte nicht bestätigt. Vor diesem Hintergrund müssen die bisher publizierten Studien kritisch betrachtet werden.

## **4.2. Das CD14 Antigen im Rahmen der Hygiene-Hypothese und atopischer Erkrankungen**

Innerhalb des letzten Jahrhunderts haben sich die Lebensbedingungen der Menschen stark verändert. Mit verringerter Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten und deutlich verbesserter Gesundheitsversorgung ist es zu einem dramatischen Anstieg asthmatischer und atopischer Erkrankungen in den industrialisierten Ländern gekommen.<sup>48</sup> Die Ursache liegt möglicherweise in einer mangelnden Stimulation der TH1-dominierten Immunantwort durch bakterielle Produkte, wie LPS, in der frühen Kindheit. Es kommt zum verminderten Heranreifen antigenpräsentierender Zellen und nachfolgend insuffizienter IL-12-vermittelter Stimulation naiver TH-Zellen.<sup>23</sup> Hier spielt CD14 eine entscheidende Rolle. CD14 dient als Rezeptor für LPS. Es induziert über den Toll-like Rezeptor 4 Mediatorstoffe und Cytokine und vermittelt so eine genetisch determinierte TH1-Immunantwort. Eine höhere Dichte des membranständigen CD14 auf Monozyten könnte zu einer erhöhten Freisetzung von IL-12 durch APC führen. Dendritische Zellen beeinflussen die IL-4- und IFN- $\gamma$ -Produktion in heranreifenden naiven T-Zellen. Die Anwesenheit von Interleukin 12 stellt ein obligatorisches Signal für die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1-Zellen dar und führt zur Entwicklung einer TH1-Antwort im frühen Lebensalter.<sup>49</sup>

Wenn Kontakt mit bakteriellen Produkten die allergische Sensibilisierung beeinflussen kann, besteht die Möglichkeit, dass genetische Faktoren ebenso wie Umweltbedingungen die Entwicklung atopischer und allergischer Erkrankungen induzieren können.<sup>40</sup> Mit Entdeckung des CD14-159C>T (rs2569190) SNP in der Promotorregion des CD14 Gens und der initial beschriebenen Assoziation des SNP mit erhöhten sCD14-Spiegeln im Serum und reduzierten IgE-Spiegeln im Serum wurde ein mögliches Kandidatengen für die genetische Regulation der Entwicklung von Atopie und Allergie beschrieben.<sup>43</sup>

Die im folgenden beschriebenen Assoziationsstudien haben den Effekt des CD14-159C>T SNP (rs2569190) auf die Regulation des IgE- und sCD14-Spiegels im Serum sowie seine Assoziation mit atopischen und allergischen Erkrankungen untersucht.

### **4.3. Die wichtigsten genetischen Assoziationsstudien über CD14 als Atopie-Kandidatengen**

1999 berichteten Baldini et. al.<sup>43</sup> initial über eine Assoziation des CD14-159C>T (rs2569190) SNP mit dem IgE-Spiegel im Serum. Es folgten zahlreiche Assoziationsstudien, deren Ergebnisse sich kontrovers darstellten. Tabelle 23 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Assoziationsstudien über CD14 als Atopie-Kandidatengen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterscheiden sich von den Resultaten, die Baldini et al.<sup>43</sup> veröffentlicht haben. Baldini et al. untersuchten 481 Kinder aus der *Tucson Children's Respiratory Study (CRS)* und genotypisierten sie für den CD14-159C>T (rs2569190) SNP. Die Allelfrequenzen der CC, CT und TT-Genotypen waren 29,4%, 49,4% und 21,3%. Die Allelfrequenz des C-Allels betrug 51,4%. In der Untergruppe der nicht-hispanischen weißen Kinder zeigten Träger des TT-Genotyps niedrigere IgE-Spiegel im Serum als Träger der Genotypen CC und CT. Die Kinder wurden nach positiven und nicht-positiven allergischen *Skin-Prick-Tests* gegenüber lokalen Aeroallergenen in zwei verschiedene Gruppen stratifiziert. Es zeigten sich nur für die Kinder, die TT-homozygot waren und positive allergische *Skin-prick-Tests* aufwiesen, signifikant niedrigere IgE-Spiegel im Serum.

Baldini et al. bestimmten für 67 CC-homozygote und 42 TT-homozygote Probanden die sCD14-Spiegel im Serum. TT-Homozygote zeigten signifikant höhere sCD14-Spiegel als Träger des CC-Genotyps. Dieses Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen der vorliegenden Studie überein. Die Assoziation zwischen CD14 TT-homozygoten Probanden und erniedrigten IgE-Spiegeln im Serum erklärten die Autoren durch den denkbaren Einfluss des CD14-159C>T (rs2569190) SNP auf die sCD14-Spiegel, die umgekehrt die IgE-Antwort und damit die Serum IgE-Spiegel regulieren.

Vercelli, Baldini et al.<sup>50</sup> führten ergänzend zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen ein systematisches Screening des CD14-Gens durch und identifizierten vier weitere SNPs an Position -1619, -1359, -1145 und -809. 390 Kinder im Alter von 11 Jahren wurden für CD14 -1359G>T (rs3138078), CD14-1145G>A (rs2569191) und CD14-159C>T (rs2569190) typisiert. Dabei stellte sich heraus, dass Träger des CD14-1359T/-1145A/-159C-Haplotyps die höchsten IgE-Spiegel und die niedrigsten sCD14-Spiegel im Serum aufwiesen. Träger der CD14-1359G/-1145G/-159T-Haplotypen zeigten die höchsten sCD14-Spiegel und die niedrigsten IgE-Spiegel. sCD14- und IgE-Spiegel zeigten hier ebenfalls ein entgegengesetztes Verhalten.

Vercelli et al. vermuteten, dass die LPS-, CD14- und TH-Differenzierung ein Teil eines komplexen Regelkreises sind, der durch verschiedene Kombinationen von Umweltfaktoren getriggert wird. So können IgE-abhängige Reaktionen entweder stimuliert oder unterdrückt werden. Allergene rufen typischerweise Reaktionen hervor, die in erhöhter TH2-Differenzierung resultieren. Eine niedrige CD14-Expression und consequenterweise verringerte LPS-induzierte IL-12 und IL-18-Produktion (Zytokine, die eine TH1-Antwort fördern) sind möglicherweise ein entscheidender Schritt in Richtung eines ungebremsten Fortschreitens der TH2-Differenzierung.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in Kooperation mit Kabesch et al.<sup>51</sup> 2048 Kinder im Rahmen der Münchener ISAAC-Studie und 890 Erwachsene auf den CD14-159C>T (rs2569190) SNP. Es konnte keine statistisch signifikante Erhöhung der Anzahl der positiven *Skin-prick*-Tests und keine Assoziation mit den IgE-Spiegeln im Serum in der untersuchten Population beobachtet werden. Eine gesteigerte Promotoraktivität des T-Allels wurde durch die erhöhten sCD14-Spiegel bei Trägern des T-Allels bekräftigt. Der Effekt des CD14-159C>T (rs2569190) SNP auf die CD14-Expression zeigte sich übereinstimmend bei verschiedenen Populationen. Der Effekt erhöhter sCD14-Spiegel auf die Regulation der IgE-Spiegel im Serum ist jedoch nicht bestätigt worden. Die fehlende Assoziation der CD14-Genotypen mit den IgE-Spiegeln im Serum sowie den atopischen Phänotypen, veranlasst zu der Hypothese, dass die CD14-Genotypen nicht in die Entwicklung allergischer Krankheiten involviert sind.



Tabelle 23: Übersicht der wichtigsten CD14-159C>T (rs2569190) Assoziationsstudien

Autor	Phänotyp	Anzahl n	Population	Ergebnis
Baldini <sup>43</sup> 1999	Asthma, Allergie, IgE, sCD14, SPT (Skin prick test)	n = 481	Amerikaner (Weiße, Hispanos) (Alter 11 Jahre)	Assoziation von CD14- 159TT-homozygoten Probanden (vs. CC) mit hohen sCD14-Spiegeln im Serum: p < 0,05 Assoziation von CD14- 159CC mit niedrigen IgE-Spiegeln im Serum (bei Probanden, die einen positiven SPT aufwiesen): p < 0,005
Gao <sup>29</sup> 1999	Asthma, Atopie, IgE	n = 300 n = 200	Britische Probanden Japanische Probanden	Britische Probanden: Assoziation von CD14- 159CC mit erhöhten IgE-Spiegeln im Serum (RAST(-) - Probanden): p < 0,05 Japanische Probanden: nicht signifikant
Ober <sup>52</sup> 2000	Asthma, Atopie, IgE	n = 693 (Gesunde Probanden, Asthmatiker, Atopiker)	Hutterites (Gründerpopulation in den USA) (Alter 6-89 Jahre)	Assoziation des CD14- 159T-Allels (in einem Haplotyp mit D5S642 185 bp-Allel) mit atopischen Individuen: p > 0,005
Alexis <sup>53</sup> 2001	Asthma, sCD14, mCD14, LPS	n = 10 (Asthmatiker) n = 8 (Gesunde Kontrollen)	Amerikaner (18 bis 50 Jahre)	nicht signifikant
Koppelman <sup>49</sup> 2001	Asthma, IgE	n = 159 (Asthmatiker) n = 158 (Ehegatten)	Erwachsene Nieder- länder (34 bis 76 Jahre)	Assoziation von CD14- 159CC (vs. CT und TT) mit erhöhten IgE- Spiegeln im Serum: p < 0,05
Vercelli <sup>50</sup> 2001	Asthma, sCD14, IgE	n = 390 (Asthmatiker)	Amerikanische Kinder (11 Jahre)	Homozygote Träger der CD14-Haplotypen -1359T/-1145A/-159C zeigen höchste IgE- und niedrigste sCD14- Spiegel im Serum: p < 0,05 Homozygote Träger der CD14-Haplotypen -1359G/-1145G/-159T zeigen niedrigste IgE- und höchste sCD14- Spiegel im Serum: p < 0,05
Lis <sup>54</sup> 2001	Asthma, sCD14, IgE	n = 50 (Asthmatiker) n = 73 (Symptomfreie Kontrollen)	Europäische Kinder (13-14 Jahre)	nicht signifikant

Autor	Phänotyp	Anzahl n	Population	Ergebnis
Heesen <sup>55</sup> 2001	mCD14, sCD14	n = 95 (Gesunde Blutspender)	Europäer (18 bis 65 Jahre)	nicht signifikant
Sengler <sup>56</sup> 2003	Asthma, Atopische Dermatitis, Allergische Rhinitis, IgE	n = 872 (Asthmatiker und Atopiker) n = 119 (Gesunde Kontrollen)	Deutsche Kinder (0 bis 10 Jahre)	nicht signifikant
Woo <sup>57</sup> 2003	Asthma, Nahrungs- mittelallergie	n = 175 (Asthmatiker) n = 77 (Nahrungsmittel- allergiker) n = 61 (Gesunde Kontrollen)	Amerikanische Erwachsene	Assoziation von CD14- 159TT mit nicht- atopischem Asthma und Nahrungsmittelallergie: p < 0,05
Leung <sup>58</sup> 2003	Asthma, Atopie, IgE, sCD14	n = 258 (Asthmatiker) n = 92 (Gesunde Kontrollen)	Chinesische Kinder	Assoziation von CD14- 159TT und erhöhten sCD14-Spiegeln i. S.: p < 0,005 Assoziation von CD14- 159CC und erhöhten IgE-Spiegeln i. S.: p < 0,05
Buckova <sup>59</sup> 2003	Asthma, Rhinitis, IgE	n = 562 (Probanden mit Asthma und/oder Rhinitis) n = 320 (Gesunde Kontrollen)	Tschechen: Erwachsene Probanden	Probanden mit Asthma und positivem SPT tragen häufiger das C- Allel des CD14- 159C>T SNP: p < 0,05 Probanden mit negativem SPT zeigen eine Überrepräsentation von CD14 TT- homozygoten Trägern: p > 0,05
O'Donnell <sup>60</sup> 2004	Atopie, Ekzem, Heuschnupfen, Asthma, IgE	n = 305 (Probanden mit Atopie, Ekzem, Heuschnupfen, Asthma)	Australier (8, 10, 12, 14, 16, 18 und 25 Jahre)	Longitudinale Studie: Assoziation von CD14- 159CC mit <i>early-onset</i> Atopie und mit AHR ( <i>airway hyperrespon-</i> <i>siveness</i> ): p < 0,05 Querschnittsstudie: Assoziation von CD14- 159CC mit Atopie im Alter von 8, 12, 14, 18: p < 0,05 Assoziation von CD14- 159CC mit IgE im Alter von 18 Jahren: p < 0,05 Assoziation von CD14- 159CC mit AHR im Alter von 8 Jahren: p < 0,05

Autor	Phänotyp	Anzahl n	Population	Ergebnis
Heinzmann <sup>61</sup> 2003	Asthma	n = 182 (Probanden mit Verdacht auf Asthma) n = 270 (Kontrollen ohne medizinische Anamnese)	Europäische Kinder (5 bis 18 Jahre)  Kontrollen: (19 bis 40 Jahre)	nicht signifikant
Kabesch <sup>51</sup> 2004	Asthma, BHR, Atopie, Heuschnupfen, SPT, sCD14, IgE	n = 2048 (Atopiker und Asthmatiker) n = 888 (Gesunde Erwachsene)	Deutsche Kinder (6 und 10 Jahre)  Deutsche Erwachsene (18 bis 67 Jahre)	Assoziation von CD14-159TT-homozygoten Probanden (vs. CC) mit hohen sCD14-Spiegeln im Serum: p < 0,05
Eng <sup>62</sup> 2004	LPS, mCD14	n = n. b.	Chinesen	Assoziation von CD14-159TT mit höherer mCD14-Expression: p < 0,05
Sharma <sup>63</sup> 2004	Asthma, IgE	n = 187 (Asthmatiker) n = 227 (Gesunde Kontrollen) n = 106 Familien (mit Asthma in der Anamnese)	Indier: Jugendliche, Erwachsene, Familien	Assoziation des CD14-159C-Allels mit erhöhten IgE-Spiegeln im Serum: p < 0,005 Assoziation des CD14-159TT-Genotyps mit niedrigen IgE-Spiegeln im Serum: p < 0,005
LeVan <sup>64</sup> 2005	Asthma, Rhinitis, Chronische Bronchitis, Pneumokoniose	n = 79 (Pat. mit Asthma, Rhinitis, Chronischer Bronchitis, Pneumokoniosen)	Männliche Amerikaner: Farmer, Nichtraucher (25 bis 89 Jahre)	Assoziation von CD14-159CT bzw. TT mit bronchialer Obstruktion: p < 0,05 Assoziation von CD14-159C>T mit FEV <sub>1</sub> (L) und FEF <sub>25-75</sub> (L/sec): p ≤ 0,05
Wang <sup>65</sup> 2005	Asthma, IgE	n = 190 (Asthmatiker)	Taiwanesen: Kinder	Assoziation des CD14-159 T-Allels mit IgE (wenn der Haplotyp das spezifische D5S2011 E Allel aufwies): p < 0,05
Kedda <sup>66</sup> 2005	Asthma, Atopie	n = 568 (Asthmatiker) n = 443 (Nicht-Asthmatiker)	Australier: Erwachsene Probanden	nicht signifikant
Litonjua <sup>67</sup> 2005	Ekzem, IgE	n = 344 (Atopiker, Asthmatiker)	Weiß amerikanische Kinder (2 Jahre)	Assoziation des CD14-159 T-Allels mit Ekzem: p < 0,005 Assoziation von CD14-159CT und TT mit erhöhten Serum-IgE-Spiegeln: p < 0,05

Autor	Phänotyp	Anzahl n	Population	Ergebnis
Choudhry <sup>68</sup> 2005	Asthma, IgE	n = 659 (Asthmatiker)	Puertorikaner, Mexikaner: Kinder (10 bis 19 Jahre)	Assoziation des CD14- 159 T-Allels mit niedrigen IgE-Spiegeln bei Exposition mit Tabakrauch: p < 0,005
Zambelli-Weiner <sup>69</sup> 2005	Asthma, IgE, sCD14	n = 747 (Asthmatiker)	Afrikaner (Barbados): Erwachsene Probanden	nicht signifikant

Tabelle 23 zeigt, dass die Ergebnisse genetischer Assoziationsstudien über das CD14-Gen als Atopie-Kandidatengen sehr widersprüchlich sind. In manchen Studien waren mit dem CD14-159TT-Genotyp hohe, in manchen Studien dagegen niedrige Serum-IgE-Spiegel assoziiert. Eine Reihe weiterer Studien zeigte keine Assoziation zwischen dem CD14-159C>T (rs2569190) SNP und den IgE-Spiegeln im Serum.

Vercelli<sup>70</sup> vermutete, dass Gen-Umwelt-Interaktionen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese komplexer Erkrankungen wie Asthma bronchiale und anderen atopischen Erkrankungen spielen, denen eine erbliche Komponente zu Grunde liegt, die aber nicht nach den Mendel'schen Gesetzen vererbt werden. Gen-Umwelt-Interaktionen sind extrem komplex und verlaufen nicht linear. So kann die gleiche genetische Variante mit gegensätzlichen Phänotypen in unterschiedlichen Umweltbedingungen assoziiert sein. Dies ist vor allem für angeborene Immunitätsgene wichtig. Sie spielen eine Rolle an der Schnittstelle zwischen Immunsystem und der krankheitserregenden Umwelt. Vercelli vermutet, dass die unterschiedlichen Ergebnisse epidemiologischer Studien zur CD14-159C>T (rs2569190) Promotermutation aus Unterschieden in den Umweltbedingungen resultieren, die essentiell wichtig sind, um die Expression des CD14-Gens zu modulieren.

Eine weitere Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse könnte darin liegen, dass CD14 nur ein Bestandteil des LPS-Signalweges ist und mit vielen anderen Co-Faktoren, wie z.B. LBP (*LPS binding protein*) und TLR-4, in die Signaltransduktion der Endotoxinstimulation involviert ist. Die Translation der Endotoxinstimulation in eine IgE-abhängige Antwort ist möglicherweise sehr komplex und beinhaltet die zeitliche Komponente der Stimulation, molekulare Interaktionen mit anderen Signalwegen und externe Signale. Es besteht die Möglichkeit, dass die Bedeutung des CD14-159C>T (rs2569190) SNP von der An- oder Abwesenheit anderer, bisher unbekannter Expositionen oder genetischer Cofaktoren in verschiedenen Populationen abhängt.<sup>70</sup>

In diesem Zusammenhang wäre auch eine dosisabhängige Beziehung zwischen bakteriellen Produkten und Reaktion des Immunsystems denkbar. Der Effekt würde sich dann nicht linear, sondern bi- oder multimodal darstellen. Dosisabhängig könnte sich ein sogenannter "Switch" einstellen, der zu entgegengesetzten Effekten abhängig von den Umweltbedingung führt.<sup>71</sup>

Zudem ist ungeklärt, ob die allergieprotektiven Effekte, die in der Hygiene-Hypothese beschrieben werden, dem Kontakt mit Endotoxin (LPS) zuzuschreiben sind. Möglicherweise fungiert LPS nur als Marker für eine andere umweltbedingte Exposition. Zur Klärung dieser Hypothese werden weitere Studien mit genau beschriebenen Umweltbedingungen nötig sein, um diese Gen-Umweltinteraktionen besser zu verstehen.<sup>72</sup>

Neben weiteren Vergleichen aus Stadt und Land, sollte ein genauestes Augenmerk auf die häusliche Situation (Geschwister, Tiere, Rauchgewohnheiten in der Familie etc.) gerichtet werden. Die Exposition gegenüber LPS geht meist mit weiteren mikrobiellen Produkten einher (beta (1(3)-glucan, bakterielle DNA). Diese Produkte stellen die mikrobielle Umwelt dar, mit welcher die Probanden in Kontakt kommen. Eine mögliche Interaktion verschiedener Umweltkomponenten kann zu einem kritischen Zeitpunkt während der Entwicklung des Immunsystems zu allergischen Erkrankungen führen. Daher sollten Zeitpunkt und Dosis der Exposition mit Umweltstoffen in kommenden Studien genauestens evaluiert werden. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund wichtig, dass es sich bei allergischen Erkrankungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um multifaktorielle Erkrankungen handelt.

Bei näherer Betrachtung der in Tabelle 23 aufgeführten Studien wird darüber hinaus deutlich, dass in vielen Studien über den CD14-159C>T (rs2569190) SNP nur sehr kleine Fallzahlen untersucht wurden. Wie in der vorliegenden Untersuchung, ist in diesen Studien mit großer Wahrscheinlichkeit ein Fehler I. Art bei der statistischen Analyse aufgetreten. In dieser Arbeit wurde in der 1. explorativen Untersuchung ebenfalls ein kleines Kollektiv (n = 200 Probanden) untersucht. Die Replikation der Studie an 690 Probanden bestätigte die grenzwertig signifikanten Ergebnisse der ersten Studie nicht. Mithin ist auch hier ein Typ I-Fehler (zufälliges, falsch positives Ergebnis) anzunehmen. Besonders hoch ist die Gefahr falsch positiver Ergebnisse, wenn *a posteriori* Subgruppen analysiert werden, bis eine Subgruppe mit signifikantem p-Wert gefunden wurde. Als Beispiel sei die Studie von Baldini et al.<sup>43</sup> genannt. Wie zuvor bereits berichtet, untersuchte die Arbeitsgruppe 481 Kinder aus der *Tucson Children's Respiratory Study (CRS)* und genotypisierten sie für den CD14C-159T (rs2569190) SNP. In der Gesamtgruppe konnte kein signifikanter Nachweis erbracht werden, dass homozygote Träger des T-Allels niedrigere Serum-IgE-Spiegel aufwiesen als Träger der anderen Genotypen.

In der Subgruppe (n = 161) der nicht-hispanischen weißen Kinder mit positivem *Skin-Prick*-Test zeigten Träger des TT-Genotyps signifikant niedrigere IgE-Spiegel im Serum als Träger der Genotypen CC und CT. Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt auch in dieser Studie ein Typ I-Fehler vor.

Eine Möglichkeit zur Vermeidung von Typ I-Fehlern ist die Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche. Eine solche Korrektur ist in den meisten der zitierten Arbeiten nicht vorgenommen worden. Nach den Kriterien, die von Colhoun und McKeigue<sup>73</sup> für genetische Fall-Kontroll-Studien vorgeschlagen wurden, sollte ein p-Wert nur im Spektrum von 0,0005 bis 0,00005 als signifikant betrachtet werden. Vor diesem Kriterium sind die Ergebnisse der 1. explorativen Studie nicht signifikant. Dies gilt jedoch auch für alle Studien, die in Tabelle 23 zitiert wurden.

Wir haben in Kooperation mit Kabesch et al.<sup>51</sup> wahrscheinlich das weltweit größte Kollektiv auf einen möglichen Zusammenhang des CD14-159C>T (rs2569190) SNP mit IgE-Serum-Spiegel und atopischen Erkrankungen untersucht. In dieser Studie mit mehr als 2000 Probanden konnte kein Nachweis über einen Zusammenhang zwischen dem CD14-159C>T (rs2569190) SNP mit Atopiephänotypen und dem intermediären Phänotyp IgE-Spiegel im Serum erbracht werden. In dieser Studie ist der erwähnte Zusammenhang erstmalig in einer Replikationsstudie mit sehr hoher Fallzahl untersucht worden. Wir haben den Effekt des CD14-159C>T SNP an erwachsenen Probanden untersucht und in Kooperation mit Kabesch et al. zusätzlich an einem Kinderkollektiv. Beide Kollektive bestanden homogen nur aus deutschen Probanden. Statistische Standards wurden streng eingehalten. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass der CD14-159C>T (rs2569190) SNP keine signifikante Rolle in der Regulation atopischer und asthmatischer Erkrankungen spielt. Er hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Regulation des IgE-Spiegels im Serum. Die Nullhypothesen müssen daher verworfen werden.

Genetische Assoziationsstudien sollten zur Vermeidung von Typ I-Fehlern (zufällige, falsch positive Ergebnisse) heute nur unter Beachtung stringenter Kriterien zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Colhoun et al. 2003<sup>73</sup>, Freimer und Sabatti 2004<sup>74</sup>, Thomas und Clayton 2004<sup>75</sup>, Wacholder et al. 2004<sup>76</sup>) durchgeführt werden. Die Größe der zu untersuchenden Kohorte sollte ausreichend groß sein<sup>74</sup>, wobei das Signifikanzlevel im Bereich  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  liegen sollte, um die Anzahl falsch positiver Resultate zu verringern.<sup>76</sup> Ein biologischer Zusammenhang zwischen Gen und definiertem Phänotyp ist wichtig, um Daten zur funktionellen Auswirkung eines SNP zu erhalten.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für Reproduzierbarkeit und Nachweis der statistischen Assoziation zwischen Polymorphismus und beobachtetem Phänotyp bei komplexen Krankheitsbildern, ist die Replikation in einer unabhängigen Kohorte.<sup>73</sup>

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Atopie ist eine komplexe Erkrankung des Immunsystems, die durch erhöhte IgE-Spiegel gekennzeichnet ist und Symptome wie Asthma, Ekzem und allergische Rhinitis aufweist. Die chromosomale Region 5q31 zeigt genetische Kopplung mit Asthma und anderen allergiebezogenen Phänotypen. Diese Region enthält ein Cytokin-Gencluster und andere Kandidatengene wie CD14. CD14 ist ein wichtiger Rezeptor, der vor allem auf der Membran von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. CD14 spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des angeborenen Immunsystems sowie in der Bindung von Liposaccharid (LPS) an TLR4. Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen hat Einfluss auf die Entwicklung einer nachfolgenden TH1-Antwort. Genetische Kopplungs- und Assoziationsstudien wiesen darauf hin, dass genetische Varianten des CD14 Gens die Entwicklung einer TH2-gesteuerten allergischen Immunantwort regulieren.

In einer ersten explorativen Studie wurden zur Überprüfung dieser Hypothese 200 Probanden untersucht. Alle Probanden wurden in einem Fragebogen zu ihrer Allergianamnese befragt. Als intermediäre Atopiephänotypen wurden der IgE-Spiegel und der sCD14-Spiegel im Serum bestimmt. Zur Kartierung der CD14 Promotor-Region wurden folgende SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) genotypisiert: CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191) und CD14-1359G>T (rs3138078). Zusätzlich wurde CD14+1443T>G (rs2563298) aus dem 2. Exon der CD14-Genregion untersucht. Die Genotypen wurden mit den IgE- und sCD14-Spiegeln im Serum assoziiert. Träger der Genotypen CD14-159TT und CD14-1145GG zeigten signifikant höhere IgE-Spiegel im Serum als Träger der anderen Genotypen. Die Genotypen CD14-159TT, CD14-1145GG und CD14-1359GG zeigten signifikant erhöhte sCD14-Spiegel im Serum. Die CD14-159C>T (rs2569190) Genotypen waren nicht signifikant mit den in der Anamnese ermittelten, distalen Phänotypen (Anamnesedaten) assoziiert. Der CD14-159C>T (rs2569190) SNP zeigte die höchste Assoziation zum IgE- und sCD14-Spiegel im Serum.

In einer Replikationsstudie mit insgesamt 690 Probanden wurde die Assoziation des CD14-159C>T (rs2569190) SNP zum Gesamt-IgE-Spiegel im Serum untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen Genotypen und Gesamt-IgE-Spiegeln im Serum, weder in der Gesamtgruppe noch nach Stratifizierung nach Alter, Geschlecht und Jahreszeit der Blutentnahme. Der CD14-159C>T (rs2569190) SNP war nicht mit den IgE-Spiegeln von gesunden Probanden assoziiert.



Es zeigte sich eine Assoziation mit der Höhe des sCD14-Spiegels, die möglicherweise eine Rolle in der Kontrolle der LPS-Empfindlichkeit von Immunzellen spielt. Dies hat jedoch keine Auswirkung auf die Gesamt-IgE-Spiegel im Serum.

In dieser Studie konnte kein Nachweis über einen Zusammenhang zwischen dem CD14-159C>T (rs2569190) SNP mit Atopiephänotypen und dem intermediären Phänotyp IgE-Spiegel im Serum erbracht werden. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass der CD14-159C>T (rs2569190) SNP keine signifikante Rolle in der Regulation atopischer und asthmatischer Erkrankungen spielt. Er hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Regulation des IgE-Spiegels im Serum. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stehen damit im Widerspruch zu zahlreichen anderen genetischen Assoziationsstudien, die einen Zusammenhang zwischen CD14 Genvarianten und Atopiephänotypen beschreiben.

Zur Vermeidung falsch positiver Resultate in genetischen Assoziationsstudien (Typ I-Fehler) sollte die untersuchte Kohorte ausreichend groß und das Signifikanzniveau im Bereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  liegen (Colhoun et al. 2003<sup>73</sup>, Freimer und Sabatti 2004<sup>74</sup>, Thomas und Clayton 2004<sup>75</sup>, Wacholder et al. 2004<sup>76</sup>). Eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Nachweis einer wahren Assoziation zwischen Polymorphismus und Phänotyp bei komplexen Erkrankungen ist die Replikation des Befundes in einer unabhängigen Kohorte.

## SUMMARY

Atopy is a complex immune disorder characterized by heightened IgE levels. It leads to asthma, eczema and allergic rhinitis. The chromosomal region 5q31 consistently shows linkage to asthma and allergy related phenotypes. This region contains a cytokine gene cluster and other candidate genes like CD14. CD14 is an important myeloid pattern recognition receptor that is predominantly expressed on the surface of monocytes, macrophages and neutrophils. CD14 plays an important role in the development of innate immunity and it presents lipopolysaccharid (LPS) to toll-like receptor 4 (TLR-4). LPS-induced activation of antigen presenting cells has been implicated in the development of an adaptive TH1 response. Linkage and association studies suggested that genetic variations of the CD14 gene may modulate the development of the TH2 driven allergic immunresponse.

To investigate this hypothesis 200 individuals were examined in a first explorative study. All individuals were interviewed in a structured questionnaire about their allergic anamnesis. IgE and sCD14 levels in serum were determined as intermediated allergic phenotypes. To map the CD14 promoter region we genotyped the following SNPs (single nucleotide polymorphisms): CD14-159C>T (rs2569190), CD14-1145A>G (rs2569191), CD14-1359G>T (rs3138078). Additionally we examined CD14+1443T>G (rs2563298) from the second exon of the CD14 gene. The genotypes were associated with IgE and sCD14 levels in serum. Carrier of the genotypes CD14-159TT and CD14-1145GG showed significant higher serum IgE levels than carrier of the other genotypes. The genotypes CD14-159TT, CD14-1145GG and CD14-1359GG showed significant increased sCD14 levels. There was no significance between the CD14-159C>T (rs2569190) genotypes and distal phenotypes (anamnesis data from the questionnaire). Compared to the other genotypes CD14-159C>T (rs2569190) showed the highest association with IgE and sCD14 levels in serum.

In a replication study we genotyped the CD14-159C>T (rs2569190) SNP in 690 individuals. Significant association of genotype and total serum IgE levels was not either observed in the whole group or after stratification for age, sex and season of blood sampling. The CD14-159C>T (rs2569190) polymorphism was not associated with the IgE levels in healthy individuals. It was associated with the height of serum sCD14 levels which may probably control LPS sensitivity of immune cells. However, this does not influence total serum IgE levels in serum.

The lack of association between CD14-159C>T (rs2569190), atopic phenotypes and the intermediate phenotype IgE level in serum indicates that CD14-159C>T (rs2569190) plays no significant role in the pathogenesis of atopy and asthma. It has as well no influence upon the regulation of IgE levels in serum. The results of this study differ to many other genetic association studies who describe an association between CD14 SNPs und atopic phenotypes. To avoid false-positive findings in genetic association studies the sample size should be large enough and statistical significance levels should be in the range of  $10^{-4}$  to  $10^{-6}$  (Colhoun et al. 2003<sup>73</sup>, Freimer and Sabatti 2004<sup>74</sup>, Thomas and Clayton 2004<sup>75</sup>, Wacholder et al. 2004<sup>76</sup>). One of the most important preconditions to show association between polymorphism and phenotype by complex diseases is replication in an independent sample.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- <sup>1</sup> **Janeway CA**, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ.  
Immunobiology: the immune system in health and disease.  
Garland Science Publishing 2005, 6. Auflage
- <sup>2</sup> **Kayser FH**, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Medizinische Mikrobiologie.  
Georg Thieme Verlag 1998, 9. Auflage
- <sup>3</sup> **Coombs RRA**, Gell PGH.  
The classification of allergic reactions underlying diseases.  
In: Gell PGH, Coombs RRA  
(eds.): Clinical aspects of immunology, (Davis Co.) Philadelphia; 317
- <sup>4</sup> **Darsow U**, Ring J.  
Atopic eczema, allergy and the atopy patch test.  
Allergy and Clinical Immunology International 2002;14:170-173
- <sup>5</sup> **Niggemann B**.  
Evolving role of the atopy patch test in the diagnosis of food allergy.  
Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2002 Jun;2(3):253-6
- <sup>6</sup> **Alexander K** et al.  
Thiemes Innere Medizin: TIM  
Thieme Verlag 1999, 6. Auflage
- <sup>7</sup> **Wüthrich B**, Roll A, Fischer B, Senti G, Schmidt-Grendelmeier.  
Aktuelles zur atopischen Dermatitis (Neurodermitis).  
Allergologie 2005;28(3):92-104
- <sup>8</sup> **Pschyrembel W** et al.  
Pschyrembel Klinisches Wörterbuch  
De Gruyter Verlag 1994, 257. Auflage
- <sup>9</sup> **Pichler WJ**.  
Regulation der Immunantwort: das TH1-/TH2-Konzept.  
Schweiz Med Wochenschr 1997;127:341-348
- <sup>10</sup> **Mackay IR**, Rosen FS.  
Advances in Immunology: Allergy and allergic diseases.  
N Engl J Med 2001 Jan;344(1):30-7
- <sup>11</sup> **Prescott S** et al.  
Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell response toward the Th2 cytokine profile.  
J Immunol 1998;160:4730-7

- <sup>12</sup> **Holt PG**, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD.  
The role of allergy in the development of asthma.  
Nature 1999;402:Suppl:B12-B17
- <sup>13</sup> **Bühling KJ**, Lepenies J, Witt K.  
Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie.  
Urban & Fischer Verlag 2000; 2. Auflage:42-51
- <sup>14</sup> **Dati F**, Ringel KP.  
Reference values for serum IgE in healthy non-atopic children and adults.  
Clin Chem 1982;28:155
- <sup>15</sup> **Hal Allergie GmbH**. Allergie-Infos  
Online im Internet: URL: <http://www.hal-allergie.de/allergie.htm>. Stand 07.06.2004
- <sup>16</sup> **Akira S**, Takeda K.  
Toll-like receptor signalling.  
Nat Rev Immunol. 2004 Jul;4(7):499-511. Review.
- <sup>17</sup> **Medzhitov R**. et al.  
A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.  
Nature 1997;388(6640):394-7
- <sup>18</sup> **Takeda K**, Akira S.  
Toll-like receptors in innate immunity.  
Int Immunol;17(1):1-14
- <sup>19</sup> **Jurk M**. et al.  
Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848.  
Nat Immunol 2002;3(6):499
- <sup>20</sup> **Ozinsky A**. et al.  
The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors.  
PNAS USA 2000;97(25):13766-71
- <sup>21</sup> **Miyake K**.  
Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2.  
Int Immunopharmacol 2003;3(1):119-28
- <sup>22</sup> **Kawai T**, Akira S.  
Pathogen recognition with Toll-like receptors.  
Curr Opin in Immunol 2005;17:338-344
- <sup>23</sup> **Baldini M**, Vercelli D, Martinez FD.  
CD14: an example of gene by environment interaction in allergic disease.  
Allergy 2002;57:188-192

- 24 **Triantafilou M**, Triantafilou K.  
Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster.  
Trends Immunol. 2002 Jun;23(6):301-4
- 25 **Wright SD**.  
CD14: a leukocyte membrane protein that functions in the response to endotoxin.  
FASEB J 1990;4:A1848 only
- 26 **Shimazu R** et al.  
MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.  
J Exp Med 1999;189(11):1777-82
- 27 **Ferrero E**, Goyert SM.  
Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14.  
Nucleic Acids Res 1988;16:4173
- 28 **Schumann RR**, Rietschel ET, Loppnow H.  
The role of CD14 and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin.  
Med Microbiol Immunol (Berl) 1994;183:279-297
- 29 **Gao PS**, Mao XQ, Baldini M, Roberts MH, Adra CN, Shirakawa T, Holt PG, Martinez FD, Hopkin JM.  
Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31.  
Clin Genet 1999 Aug;56(2): 164-5
- 30 **Goyert SM**, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM.  
The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors.  
Science 1988;239:497-500
- 31 **LeVan TD**, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D.  
A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity.  
J Immunol. 2001 Nov;167(10): 5838-44
- 32 **Bochkov VN**, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N.  
Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage.  
Nature 2002 Sep;419(6902):77-81
- 33 **Devitt A**, Moffat OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD.  
Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.  
Nature 1998;392:505-509
- 34 **Strachan DP**.  
Hay fever, hygiene and household size.  
BMJ 1989;299:1259-1260

- <sup>35</sup> **von Mutius E**, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH.  
Prevalence of asthma and atopy in two areas of East and West Germany.  
*Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:358-64
- <sup>36</sup> **von Mutius E**, Weiland SK, Fritsch C, Duhme H, Keil U.  
Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leibzig, East Germany.  
*Lancet* 1998;351:862-6
- <sup>37</sup> **Ball TM**, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL.  
Siblings, day care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood.  
*N Engl. J Med* 2000;343:538-43
- <sup>38</sup> **Riedler J**, Braun-Fahrlander C.  
Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy:  
a cross-sectional survey.  
*Lancet* 2001 Oct;358:1129-33
- <sup>39</sup> **Riedler J**, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M.  
Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization.  
Blackwell Science Ltd.  
*Clin Exp Allergy* 2000;30:194-200
- <sup>40</sup> **Vercelli D**.  
The functional genomics of CD14 and its role in IgE responses: An integrated view.  
*J Allergy Clin Immunol* 2002;109:14-21
- <sup>41</sup> **Braun-Fahrlander C**.  
The role of the farm environment and animal contact for the development of asthma and allergies.  
Blackwell Science Ltd.  
*Clin Exp Allergy* 2001;31:1799-1803
- <sup>42</sup> **Poltorak A**, He X et al.  
Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.  
*Science* 1998;282:2085-2088
- <sup>43</sup> **Baldini M**, Lohmann IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD.  
A polymorphism in the 5'flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E.  
*Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976-83
- <sup>44</sup> **Vercelli D**, Baldini M, Martinez F.  
The monocyte/IgE connection: May polymorphisms in the CD14 gene teach us about IgE Regulation?  
*Int Arch Allergy Immunol* 2001;124(1-3):20-24
- <sup>45</sup> Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema:  
ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)  
*Lancet* 1998;351:1225-1232

- <sup>46</sup> **Newton CR**, Graham A.  
PCR.  
Spektrum-Verlag 1994, 2. Auflage.
- <sup>47</sup> **Deutsche Pollenstiftung**. Pollenflugkalender  
Online im Internet: URL: [http://www.pollenstiftung.de/vorhersage\\_kalender.html](http://www.pollenstiftung.de/vorhersage_kalender.html)  
Stand: 17.06.2004
- <sup>48</sup> **Eder W**, von Mutius E.  
Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence?  
Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004;4:113-117
- <sup>49</sup> **Koppelman GH**, Reijmerink NE, Stine OC, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleecker ER.  
Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy.  
Am J Respir Crit Care Med 2001;163:965-969
- <sup>50</sup> **Vercelli D**, Baldini M, Stern D, Lohmann C, Halonen M, Martinez F.  
CD14: a bridge between innate immunity and adaptive IgE responses  
Journal of Endotoxin Research 2001;7(1):45-8
- <sup>51</sup> **Kabesch M**, Hasemann K, Schickinger V, Tzotcheva I, Bohnert A, Carr D, Baldini M, Hackstein H, Leupold W, Weiland SK, Martinez FD, Mutius E, Bein G.  
A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases.  
Allergy 2004 May;59(5):520-5
- <sup>52</sup> **Ober C**, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ.  
A Second-Generation Genomwide Screen for Asthma-Susceptibility Alleles in a Founder Population  
Am J Hum Genet 2000;67:1154-1162
- <sup>53</sup> **Alexis N**, Eldridge M, Reed W, Bromberg P, Peden DB.  
CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: Role of atopy.  
J Allergy Clin Immunol 2001 Jan;107(1):31-5
- <sup>54</sup> **Lis G**, Kostyk E, Sanak M, Pietrzyk JJ.  
Molecular studies in a population of children with bronchial asthma.  
I. Polymorphism in the promotor region of gene CD14.  
Pneumonol Alergol Pol 2001;69(5-6):265-72
- <sup>55</sup> **Heesen M**, Blömeke B, Schlüter B, Heussen N, Rossaint R, Kunz D.  
Lack of association between the -260 C>T promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene and the CD14 density of unstimulated human monocytes and soluble CD14 plasma levels.  
Intensive Care Med 2001 Nov;27(11):1770-5.



- <sup>56</sup> **Sengler C**, Haider A, Sommerfeld C, Lau S, Baldini M, Martinez F, Wahn U, Nickel R. German Multicenter Allergy Study Group. Evaluation of the CD14 C-159T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort. Clin Exp Allergy 2003 Feb;33(2):153-5
- <sup>57</sup> **Woo JG**, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK. The -159 C>T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. J Allergy Clin Immunol 2003 Aug;112(2):438-44
- <sup>58</sup> **Leung TF**, Tang NL, Sung YM, Li AM, Wong GW, Chan IH, Lam CW. The C-159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children. Pediatr Allergy Immunol 2003 Aug;14(4):255-60
- <sup>59</sup> **Buckova D**, Holla Li, Schuller M, Znojil V, Vacha J. Two CD14 promoter polymorphisms and atopic phenotypes in Czech patients with IgE-mediated allergy. Allergy 2003 Oct;58(10):1023-6
- <sup>60</sup> **O'Donnell AR**, Toelle BG, Marks GB, Hayden CM, Laing IA, Peat JK, Goldblatt J, Le Souef PN. Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age 8 to 25 years. Am J Respir Crit Care Med 2004 Mar1;169(5):555-6
- <sup>61</sup> **Heinzmann A**, Dietrich H, Jerkic SP, Kurz T, Deichmann KA. Promoter polymorphisms of the CD14 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. Eur J Immunogenet 2003 Oct;30(5):345-8
- <sup>62</sup> **Eng HL**, Wang CH, Chen CH, Chou MH, Cheng CT, Lin TM. A CD14 promoter polymorphism is associated with CD14 expression an Chlamydia-stimulated TNF alpha protection. Genes Immun 2004 Aug;5(5):426-30
- <sup>63</sup> **Sharma M**, Batra J, Mabalirajan, Goswami S, Ganguly D, Lahkar B, Bhatia NK, Kumar A, Ghosh B. Suggestive evidence of association of C-159T functional polymorphism of the CD14 gene with atopic asthma in northern and northwestern Indian populations. Immunogenetics 2004 Oct;56 (7):544-7
- <sup>64</sup> **LeVan TD**, Von Essen S, Romberger DJ, Lambert PG, Martinez FD, Vasquez MM, Merchant JA. Polymorphisms in the CD14 Gene Associated with Pulmonary Funktion in Farmers. Am J Respir Crit Care Med 2005 Apr;171(7):773-9

- <sup>65</sup> **Wang J**, Wang L, Lin CG, Chang AC, Wu LS.  
Association study using combination analysis of SNP and STRP markers: CD14 promoter polymorphism and IgE level in Taiwanese asthma children.  
J Hum Genet (2005) 50:36-41
- <sup>66</sup> **Kedda MA**, Lose F, Duffy D, Bell E, Thompson PJ, Upham J.  
The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population.  
Thorax 2005 Mar;60(3):211-4.
- <sup>67</sup> **Litonjua AA**, Belanger K, Cledón JC, Milton DK, Bracken MB, Kraft P, Triche EW, Sredl DL, Weiss ST, Leaderer BP, Gold DR.  
Polymorphisms in the 5' region of the CD14 gene are associated with excema in young children.  
J Allergy Clin. Immunol 2005 May;115(5): 1056-62
- <sup>68</sup> **Choudry Set al.**  
CD14-Tobacco Gene-Environment Interaction Modify Asthma Severity and Immunoglobulin E Levels in Latino Asthmatics.  
Am J Respir Crit Care Med 2005 May ;172(2):173-82
- <sup>69</sup> **Zampelli-Weiner A**, Ehrlich E, Stockton ML, Grant AV, Zhang S, Levett PN, Beaty TH, Barnes KC.  
Evaluation of the CD14/-260 polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study.  
J Allergy Clin Immunol 2005;115:1203-9.
- <sup>70</sup> **Vercelli D.**  
Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing.  
J Allergy Clin Immunol 2004 Mar;113(3):381-6
- <sup>71</sup> **Vercelli D.**  
Learning from discrepancies: CD14 polymorphisem, atopy and the endotoxin switch.  
Clin Exp Allergy 2003;33;153-155
- <sup>72</sup> **Eder W**, von Mutius E.  
Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence?  
Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004 Apr;4(2):113-7
- <sup>73</sup> **Colhoun HM**, McKeigue PM, Davey Smith G.  
Problems of reporting genetic associations with complex outcomes.  
Lancet 2003;361;865-872
- <sup>74</sup> **Freimer N**, Sabatti C.  
The use of pedigree, sib-pair and association studies of common diseases for genetic mapping and epidemiology.  
Nat Genet 2004;36:1045-1051

- <sup>75</sup> **Thomas DC**, Clayton DG.  
Betting odds and genetic associations.  
J Natl Cancer Inst 2004;96:421-423
- <sup>76</sup> **Wacholder S**, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N.  
Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular  
epidemiology studies.  
J Natl Cancer Inst 2004;96:434-442

## 7. ABBILDUNGS-, TABELLEN- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abbildung 1: Subpopulationen von T-Helferzellen .....	12
Abbildung 2: Pathogenese von Typ I-Allergien .....	14
Abbildung 3: Signalwege der Toll-like Rezeptoren .....	17
Abbildung 4: Der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige TLR-Signalweg .....	17
Abbildung 5: Faktoren, die die Entwicklung einer TH2-vermittelten allergischen Reaktion beeinflussen .....	22
Abbildung 6: SSP-PCR und Gelelektrophorese.....	38
Abbildung 7: De-Finetti-Diagramm und Hardy-Weinberg-Equilibrium für CD14-159C>T.....	46
Abbildung 8: Schematische Darstellung der CD14-Rezeptor Genregion auf Chromosom 5 .....	47
Abbildung 9: Mediane der IgE-Spiegel und Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP .....	49
Abbildung 10: Mediane der IgE-Spiegel und Genotypen des CD14-1145C>T (rs2569191) SNP .....	49
Abbildung 11: Mediane der sCD14-Spiegel und Genotypen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP .....	51
Abbildung 12: Mediane der sCD14-Spiegel und Genotypen des CD14-1145C>T (rs2569191) SNP .....	51
Abbildung 13: Mediane der sCD14-Spiegel und Genotypen des CD14-1359C>T (rs3138078) SNP .....	52
Abbildung 14: Assoziation der Höhe des IgE-Spiegels mit dem Alter der Probanden.....	55
Abbildung 15: Mediane IgE-Spiegel (95%CI) bei Männern und Frauen.....	56
Abbildung 16: Pollenflugkalender .....	59

	Seite
Tabelle 1:	Referenzwerte der IgE-Spiegel in Abhängigkeit vom Alter ..... 13
Tabelle 2:	Programm der SSP-PCR..... 36
Tabelle 3:	Allel- und genspezifische <i>Primer</i> für die SNPs der CD14-Genregion..... 37
Tabelle 4:	Sequenzier <i>primer</i> der CD14 Genregion ..... 37
Tabelle 5:	Programm der Sequenzierungsreaktion..... 39
Tabelle 6:	Grunddaten zu den Probanden ..... 43
Tabelle 7:	Assoziation der Anamnesedaten mit dem IgE-Spiegel im Serum ..... 44
Tabelle 8:	Allelfrequenzen der CD14 SNPs ..... 45
Tabelle 9:	Linkage Disequilibrium der CD14 SNPs ..... 47
Tabelle 10:	Assoziation zwischen CD14 SNPs und IgE-Spiegeln im Serum..... 48
Tabelle 11:	Assoziation zwischen CD14 SNPs und sCD14-Spiegeln im Serum..... 50
Tabelle 12:	Grunddaten zu den Probanden der Replikationsstudie..... 53
Tabelle 13:	Geschlechtsspezifische Stratifizierung von Alter und IgE-Spiegel im Serum ..... 54
Tabelle 14:	Allelfrequenzen des CD14-159C>T (rs2569190) SNP in der Replikationsstudie..... 57
Tabelle 15:	Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum ..... 57
Tabelle 16:	Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum, stratifiziert nach dem Geschlecht ..... 58
Tabelle 17:	Grunddaten zu den Probanden mit Sammelzeitpunkt in der Pollenflugzeit .... 60
Tabelle 18:	Grunddaten zu den Probanden mit Sammelzeitpunkt in der Nicht- Pollenflugzeit ..... 60
Tabelle 19:	Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs 2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum ..... 61
Tabelle 20:	Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs 2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum, stratifiziert nach dem Geschlecht ..... 61
Tabelle 21:	Nicht-Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum ..... 62
Tabelle 22:	Nicht-Pollenflugzeit: Assoziation zwischen CD14-159C>T (rs2569190) SNP und IgE-Spiegeln im Serum, stratifiziert nach dem Geschlecht ..... 62
Tabelle 23:	Übersicht der wichtigsten CD14-159C>T (rs2569190) Assoziationsstudien.. 70

### Abkürzungsverzeichnis

<b>ADRB2</b>	β2-Adrenorezeptor
<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
<b>CpG-DNA</b>	Cytidin-Guanosin-Dinukleotide – DNA
<b>DC</b>	<i>Dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
<b>Fc</b>	<i>Fragment crystalline</i>
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen- <i>Colony stimulating factor</i>
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>HLA</b>	<i>Human leucocyte antigen</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IKK</b>	IκK kinase
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IRAK</b>	Interleukin-1 <i>receptor-associated kinase</i>
<b>IRF</b>	<i>Interferon regulatory factor</i>
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LBP</b>	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MD2</b>	<i>LPS-bound Myeloid differentiation 2</i>
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor κB</i>
<b>NK</b>	Natürliche Killerzellen
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-associated microbial patterns</i>
<b>PGN</b>	Peptidoglycan
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>TH-Zellen</b>	T-Helfer-Zellen
<b>TIR</b>	Toll/IL-1 Rezeptor
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumor-Nekrose-Faktor
<b>TRAF6</b>	<i>Tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>

## 8. LEBENS LAUF

Name: Kathrin Hasemann  
Geburtsdatum: 30. März 1975  
Geburtsort: Hannover  
Familienstand: ledig

### Schul Ausbildung

1981 – 1985: Grundschule Holzen und Mühlenberg  
1985 – 1994: Graf-Gottfried-Gymnasium in Neheim-Hüsten  
10. Juni 1994: Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung

01. August 1994 Ausbildung zur Bankkauffrau  
bis 23. Januar 1997: Deutsche Bank AG Arnsberg  
23. Januar 1997: Abschlussprüfung zur Bankkauffrau  
IHK Arnsberg

### Arbeitsverhältnis

24. Januar 1997 als Bankkauffrau  
bis 31. März 1997: Deutsche Bank AG Arnsberg

### Studium

April 1997 (SS): Humanmedizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
08. September 1999: Ärztliche Vorprüfung  
29. August 2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
07. April 2003: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Mai 2003 bis Mai 2004: Praktisches Jahr im Stadtkrankenhaus in Soest  
Akademisches Lehrkrankenhaus der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
04. Mai 2004: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Beruflicher Werdegang**

01. Juni 2004

bis 30. September 2004:

**Ärztin im Praktikum**, Abteilung für Anästhesiologie  
und Intensivmedizin, Stadtkrankenhaus in Soest

Seit 01. Oktober 2004:

**Assistenzärztin**, Abteilung für Anästhesiologie  
und Intensivmedizin, Stadtkrankenhaus in Soest



## **Originalarbeit:**

Kabesch M, **Hasemann K**, Schickinger V, Tzotcheva I, Bohnert A, Carr D, Baldini M, Hackstein H, Leupold W, Weiland SK, Martinez FD, Mutius E, Bein G.

A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases.

Allergy. 2004 May;59(5):520-5

(IF: 3,496)

Teilnahme am Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN-1) des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), Teilprojektnummer NGFN IE-S08T06

## **Wissenschaftliche Vorträge:**

9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik, Frankfurt 2001

16<sup>th</sup> European Histocompatibility Conference, Strasbourg 2002

## **Posterpräsentation:**

17<sup>th</sup> European Histocompatibility Conference

und 11<sup>th</sup> Annual Meeting German Society of Immunogenetics, Baden-Baden 2003

## 9. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gregor Bein, Leiter des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die ausgesprochen engagierte persönliche Betreuung und jederzeitige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. Anette Bohnert danke ich für Ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und die viele Zeit, die sie investiert hat, um mir bei den Experimenten mit fachlichem Rat zur Seite zu stehen.

Bei Herrn Prof. Dr. Norbert Katz, Leiter des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH, bedanke ich mich für die Bestimmung der IgE-Spiegel.

Ich danke Herrn Dr. Michael Kabesch für die Bereitstellung der Seren aus den Kinderkollektiven München und Dresden.

Frau Monika Gerlach danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der ELISAs zur Messung der sCD14-Spiegel im Serum.

An dieser Stelle sei auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin gedankt.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für Ihre liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Herrn Dietrich Zakowski danke ich für seine Anregungen und Motivation zu jeder Zeit.